

(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND

MARKENAMT

(12) Offenlegungsschrift

(10) DE 199 41 768 A 1

(51) Int. Cl. 7:

C 12 N 1/19

C 12 N 15/81

(71) Anmelder:

Lichtenberg-Fraté, Hella, Dr., 53115 Bonn, DE

(21) Aktenzeichen: 199 41 768.7

(22) Anmeldetag: 2. 9. 1999

(23) Offenlegungstag: 15. 3. 2001

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(56) Entgegenhaltungen:

Eur. J. Biochem. 260, S.31-37; 1999;  
J. Membrane Biol. 152, S.169-181, 1996;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstämme mit Defekten in der Kaliumaufnahme

(55) Gegenstand der Erfindung sind Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstämme mit Defekten in den Kaliumtransportproteinen TKhp und Trk2.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamm, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG), aber nicht die der Hefe eigenen TKhp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert sowie ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:

a) Die Behandlung des Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals, aber nicht die der Hefe eigenen TKhp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen,

b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz,

c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransports derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.

DE 199 41 768 A 1

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstämme entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs I.

5

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstämme mit Defekten in der Kaliumaufnahme, deren Verwendung zur Expression von Kaliumionen Kanälen sowie Prozesse zur Identifizierung von Inhibitoren und/ oder Aktivatoren solcher Kaliumkanalproteine.

Die Hefe Schizosaccharomyces pombe nimmt als einzelliger Eukaryont Kalium aus der extrazellulären Umgebung auf und akkumuliert dieses Kation intrazellulär bis zu einer Konzentration von 180 mM (180 µmol/µl Zellwasser). Diese Kaliumaufnahme geschieht auch unter Bedingungen, in denen die extrazelluläre Konzentration von Kalium unter 30 µM sinkt.

Verantwortlich für diesen einwärts gerichteten Kaliumtransport ist u. a. ein in der Plasmamembran dieser Hefe lokalisierter Transportprotein TKHp (Transporter von Kalium und Protonen H<sup>+</sup>). Die Kaliumaufnahme und Kaliumtransportfunktion des Schizosaccharomyces pombe Proteins TKHp ist beispielsweise beschrieben in:

- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., Höser, M. (1996). J. Membrane Biol. 152: 169–181

20

Ein Schizosaccharomyces pombe Hefestamm mit einer Mutation im TKHp ist im Vergleich zu dem Wildstamm weiterhin in der Lage auf Medien mit so geringen extrazellulären Kaliumkonzentrationen wie 1 mM oder weniger im Kulturnedium gut zu wachsen, wie z. B. beschrieben in:

25 – Balcells et al., (1999) Eur. J. Biochem. 260: 31–37

Vom Sanger Center, Cambridge, England wurde 1997 aus dem Gesamtgenom der Hefe Schizosaccharomyces pombe ein vermutliches Gen SPAC1F5.12 (Chromosom I, Cosmid C1F5, offener Leserahmen 12) veröffentlicht.

30 – <http://www.sanger.ac.uk/yeast/home.html>

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz hohe Ähnlichkeit (37%) mit dem Kaliumaufnahmeprotein TKHp aus Schizosaccharomyces pombe aufweist. Dieses Gen ist bisher nicht isoliert und/oder funktionell charakterisiert worden.

Das bisher bekannte und zur Kaliumaufnahme notwendige Transportprotein TKHp und das vermutete zweite Kaliumtransportprotein aus Schizosaccharomyces pombe gehören aufgrund der hohen Homologie sowohl auf Nukleinsäure- als auch auf Aminosäureebene zu einer phylogenetisch konservierten Klasse von Kaliumtransportproteinen (Transporter von Kalium), deren nächst verwandte Mitglieder in der Hefe Saccharomyces cerevisiae beschrieben wurden, z. B. in:

- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). J. Bacteriol. 159: 940–945
- Gaber, R. F., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1988). Mol. Cell. Biol. 8: 2848–2859
- Ko, C. and Gaber, R. F. (1991). Mol. Cell. Biol. 11: 4266–4273

Aus einer Vielzahl von Spezies wurden durch die Anwendung von molekulärbiologischen Techniken eine Reihe von Kaliumkanälen isoliert. Allgemein sind Ionenkanäle Transmembranproteine, die selektiv den Fluß bestimmter, spezifischer Ionen durch Membranen vermitteln. Unter den bisher bekannten Ionenkanälen stellen Kaliumkanäle (K<sup>+</sup>-Kanäle) die zahlreichste und heterogenste Gruppe dar. Sowohl in erregbaren als auch in nicht-erregbaren Zellen sind sie ihr die Aufrechterhaltung des Ruhepotentials verantwortlich. Die durch Kaliumionen-Kanäle vermittelten Auswärtsströme sind die Grundlage sowohl der Form und Frequenz als auch der Repolarisierung von Aktionspotentialen in erregbarem Gewebe. Kaliumionen-Kanäle sind ubiquitäre Membranproteine mit einer erstaunlichen Vielfalt elektrischer Eigenschaften, wobei viele der "klassischen" spannungsabhängigen K<sup>+</sup>-Kanäle der sogenannte Kv-Familie (Abkürzung v ihr voltagge = spannungsabhängig) zugeordnet werden.

Während der letzten Jahre demonstrierten eine Reihe von Arbeiten eine Anzahl menschlicher Krankheiten als Resultat von Mutationen in für Kaliumionen-Kanäle kodierenden Genen. So verursacht z. B. eine Punktmutation im Kaliumkanal Kv1.1 die Episodische Ataxie wie beschrieben in:

55

- Adelmann, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. and Mylic, J. (1995). Neuron 15: 1449–1454

Das LQT Syndrom ist eine Krankheit, die die ventrikuläre Repolarisation betrifft. Eine verzögerte Repolarisation ventrikulärer Myozyten verursacht eine Verlängerung des QT Intervalls im Elektrokardiogramm (EKG). Das LQT Syndrom wird meist als autosomal dominante oder rezessive Krankheit vererbt. Wenn die ventrikulären Arrhythmien zur Fibrillation degenerieren kann plötzlicher Tod die Folge sein.

In diesem Zusammenhang ist die Rolle des humanen erg (human eag related gene, HERG) Kaliumionen-Kanals im Herzen von besonderem Interesse. In ventrikulären Myozyten sind repolarisierende Kaliumströme, genannt "delayed rectifier", aktiv, die sich aus mehreren Komponenten zusammensetzen. Diese multiplen Komponenten werden anhand der Geschwindigkeit ihrer Aktivierung (schnell = rapid = I<sub>Kr</sub>; langsam = slow = I<sub>ks</sub>) und ihrer unterschiedlichen Pharmakologie unterschieden. Die schnelle Komponente I<sub>Kr</sub> wird durch Klasse III anti-arrhythmische Agentien wie D-Sotalol, Dofetilid und Clofildium blockiert. Die durch den HERG Kaliumionenkanal-Kanal vermittelten Ströme entsprechen den in isolierten Herzmuskelzellen gemessenen schnellen I<sub>Kr</sub> Komponente des "delayed rectifier", wie beschrieben in:

- Lees-Miller, J. P., Kondo, C., and Wang, L. (1997). Circ. Res. 81: 719-723

HERG vermittelte Kaliumionenströme tragen zur Verkürzung der Aktionspotentiale bei schnellerer Herzschlagrate bei. Mutationen in HERG verursachen eine erbliche Form der polymorphen ventrikulären Arrhythmie (torsades des pointes), auch bekannt als LQT2 Syndrom, wie beschrieben in:

- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M.-T. (1995). Cell 81: 299-307
- Curran, M. E., Splaski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. and Keating, M. T. (1995). Cell 80: 795-803
- Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (1996). Science 272: 681-685

Ein weiteres Syndrom (LQT1) wird durch einen Defekt im Kaliumionen-Kanal Gen Kv-LQT1 bedingt, wie beschrieben in:

- Wang, Q., M. E. Curran, I. Splawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Toubin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors & M. T. Keating (1996). Nat. Genet. 12: 17-23

Kaliumionen-Kanal Modulatoren sind daher wertvolle pharmakologische Agentien mit therapeutischer Anwendung. Hoch-selektive Blocker (Toxine) und/oder Aktivatoren sind nur für eine relativ begrenzte Anzahl von Kaliumionen-Kanälen bekannt. Traditionell werden die meisten pharmakologisch wirksamen Substanzen und agrochemischen Produkte durch Massen-Durchmusterung chemischer oder natürlicher Banken entdeckt. Neue Substanzen werden üblicherweise in stabilen, Kaliumionen-Kanal Gene exprimierenden Säugerzelllinien getestet. Jedoch ist dieses Verfahren durch das Vorhandensein endogener Kanäle in den verwendeten Zelllinien erschwert und für biotechnologische Zwecke (homologe und heterologe Expression von Kaliumionen-Kanälen) verständlicherweise nicht geeignet. Die Nachteile zur Verwendung tierischer Zelllinien sind insbesondere:

- Die Kultivierung tierischer Zelllinien ist wesentlich komplizierter, finanziell aufwendig sowie kontaminationsanfällig.
- Homolog und/oder heterolog exprimierte Kaliumionen-Kanäle beeinflussen das Wachstum tierischer Zelllinien nicht.
- Das Vorhandensein endogener Kaliumionen-Kanäle erschwert die Auswertung der experimentellen Daten.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, diese Nachteile zu vermeiden und Schizosaccharomyces pombe Hefestämme als alternatives Expressionssystem zur funktionellen Expression von Kaliumionen-Kanal Genen zu entwickeln und zur Verfügung zu stellen. In der Biotechnologie besteht ein Bedarf an gut wachsenden Hefewirtsstämmen für die heterologe Expression von Kaliumionen-Kanal Genen aus höheren Eukaryonten. Insbesondere besteht ein Bedarf an stabilen Hefewirtsstämmen für die heterologe Expression von in menschlichen Krankheiten involvierten, Kaliumionen transportierenden Kaliumionen-Kanal Genen für pharmakologische Zwecke.

Diese Aufgabe wird durch einen genetisch modifizierten Schizosaccharomyces pombe Hefestamm gelöst, erhältlich durch die Einführung eines oder mehrerer selektiver Marker (Auxotrophie und/oder Resistenzen), der die Nukleinsäuresequenz für ein humanes erg Kaliumionen-Kanalprotein (HERG) oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanalproteins exprimiert, aber nicht die der Hefe eigenen TKH<sub>p</sub> oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamm, der Mutationen in den Kaliumtransportproteinen TKH<sub>p</sub> und Trk2 beinhaltet. Das vermutete, aber bisher nicht charakterisierte Schizosaccharomyces pombe Gen SPAC1F5.12 (Chromosom I, Cosmid C1F5, offener Leserahmen 12) wurde Trk2 benannt und das Genprodukt (Protein) auf seine Kaliumtransportfunktion hin funktionell analysiert. Zum Erhalt des doppelt-mutanten Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamm wurden beide Kaliumtransportproteine sukzessive durch gezielte Gendeletion und Gendisruption ausgeschaltet. Der erzeugte doppelt-mutante Hefewirtsstamm mit Defekten in der Kaliumaufnahme zeigt Wachstumsdefekte auf Kulturmédien mit minimalen Kaliumkonzentrationen von 1 mM oder weniger. Im Vergleich zum Schizosaccharomyces pombe Wildstamm bedarf dieser mutante Hefewirtsstamm eines Zusatzes von mindestens 50 mM Kalium im Kulturmedium um vergleichbar gut zu wachsen.

Die selektierbaren biosynthetischen Markergene (Auxotrophicbedürfnisse und/oder Resistenzen) können durch rekombinante DNS Techniken in die Loci der Wildtyp Kaliumtransportergene eingeführt werden. Geeignete selektierbare Marker sind z. B. die Auxotrophiemarker Ura4, His7, ade2 und LEU2 oder Gene, die eine Resistenz z. B. gegen Kupfer (CUP1 Gen) oder G418 (Aminoglycosid Phosphotransferase Gen) bewirken. Solche modifizierten Allele können dann in Hefe transformiert werden, wo sie durch homologe Rekombination die Wildtyp Loci ersetzen. Die modifizierten Allele können durch Selektion auf den oder die biosynthetischen Marker ermittelt werden. Die in die Loci der Kaliumtransporter eingeführten selektierbaren biosynthetischen Marker stellen außerdem einen einfachen Weg zum Transfer dieser Mutationen in genetisch andere Linien dar (Kreuzung). Ein Stamm, der eine Mutation in einem Kaliumtransporter (z. B. TKH<sub>p</sub>) beinhaltet, kann mit einem Stamm des entgegengesetzten Paarungstyps, der eine Mutation in einem anderen Kaliumtransporter (z. B. Trk2) trägt, gekreuzt werden. Die Nachkommenschaft kann dann auf die Anwesenheit beider biosynthetischer Marker hin selektiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamm der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG), aber nicht die der Hefe eigenen TKH<sub>p</sub> oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert sowie ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:

- a) Die Behandlung des *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals aber nicht die der Hefe eigenen TKHIp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen.
- b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
- c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransports derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.

Dieses Verfahren ist zur Identifizierung spezifischer Modulatoren des HERG Ionenkanals geeignet.

Der Wachstumsdetekt des mutanten *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstamms kann zur Isolierung und Anreicherung von Kaliumionen-Kanalgenen aus Genbibliotheken (z. B. humane cDNA Bibliotheken) verwendet werden.

- wenn die exprimierten Gene die Mutationen in dem doppelt-mutanten Hefewirtsstamm komplementieren und ein Wildtypphänotyp hinsichtlich der benötigten Kaliumkonzentration resultiert. Damit können Kaliumionen-Kanäle identifiziert werden, die zwar physiologisch beschrieben, aber bisher noch nicht isoliert wurden. Alternativ können verschiedene Kaliumionen-Kanäle in die Doppel-Mutante eingeführt werden, um zu testen, ob der Wachstumsdefekt auf Kalium limitierten Medien komplementiert wird. Der *Schizosaccharomyces pombe* Wildtypphänotyp kann durch Auswahl derjenigen Stämme, welche nach Transformation, Selektion und nach Anzucht unter Bedingungen von 10 mg/l Kalium im Kulturmedium ermittelt werden.

Jede dieser Anwendungen resultiert in einem Hefestamm, der heterolog einen fremden Kaliumionen-Kanal exprimiert und zur Durchmusterung von Modulatoren des betreffenden Kaliumionen-Kanals verwendet werden kann. Ein Hefestamm, der heterolog einen fremden Kaliumionen-Kanal exprimiert, kann in einfachen Verfahren zur Durchmusterung verschiedener Testsubstanz-Bibliotheken verwendet werden. Diese einfache Verfahren, in denen Wachstumsveränderungen oder gesteigerte und/oder verminderte Kaliumaufnahme durch Agarplattentests und/oder in Flüssigkultur beobachtet werden kann, können somit spezifische Substanzen detektieren, die die Kaliumionen-Kanal Funktion modulieren. Zur Durchmusterung auf Aktivatoren einer Kaliumionen-Kanal Funktion kann das Durchmusterungsverfahren solche Veränderungen wie metabolische Aktivität, gesteigerte Wachstumsrate oder gesteigerte Kaliumionen Aufnahme beinhalten. Zur Durchmusterung auf Inhibitoren einer Kaliumionen-Kanal Funktion kann das Durchmusterungsverfahren solche Veränderungen wie verminderte Wachstumsrate oder verminderte Kaliumionen Aufnahme beinhalten. Die Testsubstanzen, die im Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren eingesetzt werden, können z. B. synthetische oder natürliche Produkte sein. Natürliche Produkte beinhalten pflanzliche, tierische oder mikrobielle Extrakte.

- In Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der genormischen Fragmente, die die Wildtyp TKHIp und Trk2 Loci enthalten sowie die entsprechenden mutierten Allele trk1::LEU2, trk2::Ura4 und trk2::adhHerg/Ura4 dargestellt. Die TKHIp und Trk2 kodierenden Regionen sind durch schwarze Balken gekennzeichnet. Die mutanten Allele wurden zum Ersatz der entsprechenden Wildtyp Loci in *Schizosaccharomyces pombe* Stämme transformiert.

In Fig. 2 ist die abgeleitete Aminosäure- (SEQ. ID. NO. 2) und die Nukleinsäuresequenz (SEQ. ID. NO. 1) des *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransportproteins TKHIp dargestellt. Die durch Unterstrich hervorgehobene Region entspricht der deletierten und durch den biosynthetischen Marker LEU2 ersetzen Sequenz.

In Fig. 3 ist die abgeleitete Aminosäure- (SEQ. ID. NO. 4) und die Nukleinsäuresequenz (SEQ. ID. NO. 3) des *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransportproteins Trk2 dargestellt. Die durch Unterstrich hervorgehobene Region entspricht der Eco RV Stelle, in die der biosynthetische Marker Ura4 eingeführt wurde.

- In Fig. 4 ist die Nukleinsäure- (SEQ. ID. NO. 5) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ. ID. NO. 6) des humanen erg Gens (HERG) dargestellt. Die Sequenz entspricht der in der Originalpublikation von Trudeau, M. C., Warmke, J. W., Ganetzky, B. and Robertson, G. (1995). Science 269: 92-95 beschriebenen.

In Fig. 5 ist das Wachstum der erzeugten *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransport defekten Mutanten in Abhängigkeit von der Kaliumkonzentration im Kulturmedium gezeigt. Die Stämme wurden auf Vollmedium, pH 4.5 bei 30°C über Nacht angezogen und anschließend auf 100 mM, 10 mM und 1 mM Kalium enthaltende Agarplatten replika-platiert. Die Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Der *Schizosaccharomyces pombe* Hefestamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen (Doppel-Mutante) wächst unter Bedingungen von 1 mM Kalium im Medium nicht.

Fig. 6 zeigt das Wachstum vom *Schizosaccharomyces pombe* Wildstamm, der Kaliumtransport Doppel-Mutante sowie den modifizierten Hefestamm, der das humane erg Gen (HERG) exprimiert auf 100 mM, 10 mM und 1 mM Kalium enthaltenden Agarplatten. Die Platten wurden bei 30°C für zwei Tage inkubiert. Im Gegensatz zur *Schizosaccharomyces pombe* Kaliumtransport Doppel-Mutante ist der das humane erg Gen (HERG) exprimierende Stamm in der Lage, auf 1 mM Kalium im Medium zu wachsen.

In Fig. 7 ist die Wirkung bekannter Inhibitoren des HERG Kaliumionen-Kanals dargestellt. Der HERG exprimierende modifizierte *Schizosaccharomyces pombe* Stamm wurde auf Vollmedium, pH 4.5 bei 30°C über Nacht angezogen und anschließend auf 1 mM Kalium enthaltende Agarplatten in der Gegenwart von 1 mM Barium, 1 mM Cäsium und 40 µM Lanthan replika-platiert. Durch die Inhibition des heterolog exprimierten Gens kann der modifizierte *Schizosaccharomyces pombe* Stamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen nicht mehr wachsen.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

60

### Beispiele

#### Allgemeine Methoden

#### Rekombinante DNA Technik

65

Zur Anreicherung und Manipulation von DNA wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al., In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989), beschrieben sind. Die verwendeten molekulargenetischen Reagenzien wurden nach den Angaben der Hersteller einge-

setzt.

## Hefetransformation

Schizosaccharomyces pombe Stämme wurden entsprechend der Methode, wie sie von Moreno, S. et al., (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Methods in Enzymology 194: 795-824, beschrieben sind, transformiert.

## Beispiel 1

## 1.1 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante tkh

Die Mutation in dem Schizosaccharomyces pombe Kaliumionen-Transporter TKHp wurde in dem Plasmid pIL61SPF1, das die kodierende Nukleinsäuresequenz mit 2958 Basenpaaren (bp) für diesen Transporter enthält, wie beschrieben in Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., Höfer, M. (1996). J. Membrane Biol. 152: 169-181, durchgeführt.

In dem Gen wurde eine 1102 bp Deletion in der kodierenden Region durch Spaltung mit der Restriktions-endonuklease Hind II eingeführt. Die DNS Fragmente wurden durch Agarosegelektrophorese getrennt und das größere Fragment (6684 bp), das die restlichen Transportersequenzen sowie Vektoranteile enthält isoliert und gereinigt. Zum Erhalt einer Deletions/Insertionsmutation wurde das LEU2 Sma I/Hind II Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* als biosynthetischer Marker durch Ligation mit dem TKII Restfragment eingeführt. Das resultierende mutante Allel tkh::LEU2 (Fig. 1) wurde als lineares Not I Konstrukt zur Transformation des Schizosaccharomyces pombe Wildstammes h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 verwendet. Die Auswahl erfolgreich transformierter Kolonien erfolgte durch die Selektion auf Leucin Prototrophie. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Kaliumtransporter TKHp erfolgte durch Restriktionsspaltung genomicscher Schizosaccharomyces pombe DNS und Southern blot Hybridisierung, wie beschrieben in Saribrook, J. et al. In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Der durch Mutation des Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporters TKHp resultierende mutante Phänotyp (Genotyp h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) wächst im Vergleich zum Wildstamm auf Kalium limitierten Medien gleich gut (Fig. 5). Daher wurde die Aktivität eines weiteren spezifischen Kaliumtransporters in dieser Schizosaccharomyces pombe Mutante postuliert.

## 1.2 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante trk2

Zur Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Mutante trk2 wurde mit den Oligonukleotiden SpTRK2#5 5' CAC GGA TCC ACA GAT TTT ATC ATG CAG TTA TCG GGT TTT TCT ACA AAC GGT TCC 3' (SEQ. ID. NO. 7) welches der 5' kodierenden Region des Start-Codons ATG entspricht (Position -21 bis +33), und SpTRK2#H3 5' CGC GAA AGA AGC TTG GGC GA 3' (SEQ. ID. NO. 8) welches komplementär zur 3' kodierenden Region der Hind III Restriktionsstelle an Position 625 ist (Position +593 bis +612), ein 625 bp langes Fragment durch die Polymerase-Ketten-Reaktion aus genomicscher DNS der Schizosaccharomyces pombe Mutante h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 amplifiziert. Nach Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Hind III wurde dieses Fragment mit dem entsprechend gespaltenen bakteriellen Plasmidvektor pBSKII (Firnia Stratagene, Heidelberg) ligiert. Im resultierenden Plasmid pBT2 wurde durch Sequenzierung das 625 bp Teilstück des Kaliumtransporters Schizosaccharomyces pombe Trk2 bestätigt. Das erhaltene Konstrukt wurde durch Spaltung mit der Restriktionsendonuklease Eco RV an Position 246 im Trk2 Genfragment linearisiert und das die Disruptions/Insertionsmutation durch Ligation des Ura4 Sma I/Hind II Gens aus Schizosaccharomyces pombe als biosynthetischer Marker eingeführt (Fig. 1). Das gewünschte Plasmid (pBT2URA), das das mutante Allel trk2::Ura4 enthält, wurde durch Restriktionskartierung und Polymerase-Ketten-Reaktion mit den o. g. Oligonukleotiden als 2.3 kb Fragment bestätigt. Das erhaltene mutante Allel trk2::Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Bam HI/Kpn I Konstrukt zur Transformation des Schizosaccharomyces pombe Wildstammes (h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31) verwendet. Die Transformation des Wildstammes führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Mutante in der singulär der Kaliumtransporter Trk2 (Genotyp h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 trk2::Ura4) disruptiert ist. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Uracil Prototrophie hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter Trk2 erfolgte durch Southern blot Hybridisierung.

Nach Mutation des Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporters Trk2 wurde der resultierende mutante Phänotyp (Genotyp h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 trk2::Ura4) im Vergleich zum Wildstamm-Phänotyp und der Kaliumtransporter Mutante tkh getestet (Fig. 5). Die singuläre Mutation des Kaliumtransporters Trk2 zeigte im Vergleich zum Wildstamm und der Kaliumtransporter Mutante tkh auf Kalium limitierten Medien gleiches Wachstum.

## 1.3 Konstruktion der Schizosaccharomyces pombe Doppel- Mutante tkh trk2

Das erhaltene mutante Allel trk2::Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Bam HI/Kpn I Konstrukt zur Transformation der Kaliumtransporter Mutante tkh (h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) verwendet. Die Transformation Mutante tkh führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Doppel-Mutante in der beide Kaliumtransporter TKHp und Trk2 (Genotyp Mutante (h<sup>-</sup> ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 trk2:: Ura4) deletiert und disruptiert sind. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Leucin und Uracil Prototrophie hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten Mutation im Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter Trk2 erfolgte durch Southern blot Hybridisierung.

Die Bestätigung, daß Trk2 der gesuchte weitere Schizosaccharomyces pombe Kaliumtransporter ist, erfolgte durch Ausplattierung des erzeugten Hefestamms im Vergleich zum Wildstamm und der Kaliumtransporter Mutante tkh auf Kalium limitierten Medien (Fig. 5). Der Phänotyp der Kaliumtransporter Doppel-Mutante tkh trk2 ist dadurch gekennzeichnet, daß Zellen dieses Hefestamms auf Konzentrationen kleiner 1 mM Kalium im Kulturmedium nicht lebensfähig sind.

5

#### 1.4 Konstruktion des HERG exprimierenden Schizosaccharomyces pombe tkh trk2 Stamms

Das Gen für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG) wurde durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Bam HI und Eco RI als 3.5 Kilobasenpaar (kb) Fragment aus dem Plasmid pcDNA1-HERG (erhalten von Dr. G. Robertson, University of Wisconsin, Madison, USA) und Auftrennung durch Agarosegelektrophorese erhalten.

Zur Transkription eines humanen Gens in der Hefe Schizosaccharomyces pombe ist ein Hefe-eigener Promotor notwendig. Der in Schizosaccharomyces pombe konstitutiv aktive adh Promotor (Alkohol Dehydrogenase Gen) wurde als Sal I/Bam HI Fragment aus dem Plasmid pEV11, wie beschrieben in Moreno, S. et al., (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Methods in Enzymology 194: 795-824, nach Auftrennung durch Agarosegelektrophorese isoliert. In einer Dreifach-Ligation wurden die adh Sal I/Bam HI und HERG Bam HI/Eco RI Fragmente mit dem Sal I/Eco RI gespaltenem Plasmidvektor pBSKII ligiert. Das gewünschte Plasmid pBSKII-Herg wurde durch Restriktionskartierung bestätigt. Aus diesem Plasmid wurde ein 4.6 kb adh-Herg Verbundfragment durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen Hinc II und Xba I und nach Auftrennung durch Agarosegelektrophorese erhalten. In diesem Verbundfragment wurden die überstehenden Nukleotidenden der Xba I Stelle durch DNS Polymerase I aufgefüllt.

In dem Plasmid pBT2Ura (siehe 1.2), welches das mutante Allel trk2::Ura4 enthält, wurde mit der Restriktionsendonuklease Eco RI eine Linearisierung an Position 251, direkt vor dem Ura4 Gen durchgeführt, die überstehenden Nukleotidenden der Eco RI Stelle durch DNS Polymerase I aufgefüllt und durch Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Dieses linearisierte Fragment wurde mit dem 4.6 kb adh-Herg Verbundfragment ligiert (Fig. 1). Das gewünschte Plasmid wurde Restriktionskartierung identifiziert. Das erhaltene mutante Allel trk2::adh-Herg/Ura4 (Fig. 1) wurde als lineares Xba I/Kpn I 7.0 kb Fragment nach Auftrennung durch Agarosegelektrophorese zur Transformation der Kaliumtransporter Mutante tkh ( $h^+$  ade6-M210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2) verwendet. Die Transformation dieser tkh Mutante führte zum Erhalt einer Schizosaccharomyces pombe Doppel-Mutante, in der der Kaliumtransporter TKIIp deletiert ist und der Kaliumtransporter Trk2 durch die stabile Einführung des humanen erg Gens (HERG) disruptiert ist. Anstelle des Kaliumtransporters Trk2 wird in diesem Schizosaccharomyces pombe Stamm (Genotyp  $h^+$  ade6-H210 ura 4-D18 leu1-31 tkh::LEU2 trk2::adh-Herg/Ura4) der HERG Kaliumionen-Kanal exprimiert. Die Selektion positiver Transformanten erfolgte auf die Leucin und Uracil Prototrophic hin. Die Bestätigung der durch homologe Rekombination eingeführten stabilen Integration des humanen erg Gens (HERG) an den Schizosaccharomyces pombe Trk2 Locus erfolgte durch RNS Analyse.

Die Expression des HERG Kaliumionen-Kanals den restauriert Phänotyp der Kaliumtransporter Doppel-Mutante tkh trk2 auf Kalium limitierten Medien (Fig. 6). Durch Expression des HERG Kaliumionen-Kanals können Zellen dieses genetisch modifizierten Hefestamms im Gegensatz zur Doppel-Mutante tkh trk2 auf Konzentration kleiner 1 mM Kalium gut wachsen. Die Restaurierung des Wildtyp Phänotyps ist abhängig von der heterologen Expression des HERG Kaliumionen-Kanals, wie anhand der Inhibition von HERG auf 1 mM Kalium enthaltenden Agarplatten in der Gegenwart von 1 mM Barium, 1 mM Cäsium und 40 µM Lanthan bestätigt (Fig. 7). Durch die Inhibition des HERG Kaliumionen-Kanals kann der Schizosaccharomyces pombe Stamm mit Defekten in beiden Kaliumtransportproteinen auf der 1 mM Kaliumkonzentration nicht mehr wachsen.

#### 1.5 Wachstumstests auf Kalium limitierten Medien

45

Kulturen von Schizosaccharomyces pombe Wildstamm, der Kaliumtransport defekten Mutanten tkh, trk2 und tkh trk2 und dem HERG exprimierenden Stamm wurden im Vollmedium YEP (2% yeast extract, 1% peptone) mit 2% D-glucose, pH 4.5 bei 30°C über Nacht unter Schütteln angezogen. Serielle Verdünnungen wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C über Nacht inkubiert und auf selektive Agarplatten (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2% D-glucose, pH 4.5) mit 100(A), 10(B) oder 1(C) mM KCl replika-plattierte. Diese Platten wurden für 48 Stunden bei 30°C inkubiert.

#### 1.6 Wachstumstests in Gegenwart von Inhibitoren

Kulturen von Schizosaccharomyces pombe Wildstamm, der Kaliumtransport defekten Mutante tkh trk2 und dem HERG exprimierenden Stamm wurden im Vollmedium YEP (2% yeast extract, 1% peptone) mit 2% D-glucose, pH 4.5 bei 30°C über Nacht unter Schütteln angezogen. Serielle Verdünnungen wurden auf Vollmedium-Agarplatten ausgestrichen, bei 30°C über Nacht inkubiert und auf selektive Agarplatten (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2% D-glucose, pH 4.5) mit 1 mM KCl und 1 mM Barium (A), 1 mM Cäsium (B) und 40 µM Lanthan (C) replika-plattierte. Diese Platten wurden für 48 Stunden bei 30°C inkubiert.

#### Publikationsliste

- Adelmann, J. P., Bond, C. T., Pessia, M. and Mylie, J. (1995). Episodic ataxia results from voltage-dependent potassium channels with altered functions. *Neuron* 15: 1449-1454  
 65 Balcells, L., Calero, F., Gomez, N., Ramos, J. and Arino, J. (1999) The Schizosaccharomyces pombe Pzh1 protein phosphatase regulates Na<sup>+</sup> ion influx in a Trk1-independent fashion. *Eur. J. Biochem.* 260: 31-37  
 Curran, M. E., Splaski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D. and Keating, M. T. (1995). A molecular basis for

# DE 199 41 768 A 1

- cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 80: 795–803
- Gaber, R. F., Styles, C. A. and Fink, G. R. (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2848–2859
- Keating, M. T. and Sanguinetti, M. C. (1996). Molecular genetic insights into cardiovascular disease. *Science* 272: 681–685
- Ko, C. and Gaber, R. F. (1991). TRK1 and TRK2 encode structurally related K<sup>+</sup> transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4266–4273
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M. and Höfer, M. (1996). The SpTRK gene encodes a potassium-specific transport protein TKH<sub>p</sub> in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Membrane Biol.* 152, 169–181
- Lees-Miller, J. P., Kondo, C., and Wang, L. (1997). Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K<sup>+</sup> channel in mouse and human hearts. *Circ. Res.* 81: 719–723
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology* 194: 795–824
- Rodriguez-Navarro, A. and Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 940–945
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanguinetti, M. C., Jiang, C., Curran, M. E., and Keating, M. T. (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel. *Cell* 81: 299–307
- Wang, Q., M. E. Curran, I. Siplawski, T. C. Burn, J. M. Millholland, T. J. VanRaay, J. Shen, K. W. Timothy, G. M. Vincent, T. de Jager, P. J. Schwartz, J. A. Toubin, A. J. Moss, D. L. Atkinson, G. M. Landes, T. D. Connors & M. T. Keating (1996). Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet* 12: 17–23

5

10

15

20

30

35

40

45

50

55

60

65

## Sequenzliste

## 1. Allgemeine Information

- 5        a) Anmelder: Dr. Hella Lichtenberg-Frate  
       b) Titel: *Schizosaccharomyces pombe* Hefewirtsstämme mit Defekten in der  
             Kaliumaufnahme  
       c) Anzahl der Sequenzen: 8  
 10       d) Korrespondenzadresse: Dr. Hella Lichtenberg-Frate, Botanisches Institut,  
             Kirschallee 1, 53115 Bonn

## 2. Information zur SEQ ID NO.1

## a) Sequenzcharakteristika

- 15       1. Länge: 2958 Basenpaare  
       2. Typ: Nukleinsäure  
       3. Strang: Einzelstrang  
       4. Topologie: linear

## b) Molekültyp: cDNS

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.1

SQ       SEQUENCE 2958 BP; 824 A; 577 C; 551 G; 1006 T; 0 OTHER;  
 AAAGAAGACG CGATTTACG TTGTATTATA AGAGAGGAAT CCTCAAGTAT TGTTGAAAGG  
 AATCGTAAA GATTGGTAA AAATGTCGTT TGTCAATTGT CATAATTCCC TTTAGAAAT  
 25       TTAGTGGTTT CCTCATCAGT ATCGCTTTA CCCGTAGATT TCAAAACTAA TTGCTTCTTA  
             TCTTGTCAT AGTTAAGGAT TTCCGTTAAC TTCAAACCAA TTTCTCTGTT TCTTGTTCTG  
             TTGTTGGTGG GTTGGCTGG AACTATTGAC TAAAATAAAT GGTCCTAAAT TACATTCAA  
 30       GATGGTTCAA GTGGGTGATA CCAACTTTG GATTCAAGGC AATTCAATTAT ATTTACATAT  
             ATCCCTTAACG ATCATTGCCG CTGTCCTACT TTTTACCGGA GGGACCACCA CGAAAATCAA  
             GTATATCGAT GCTTTATTCT TAGCTAGCAG CGCAACTACC CAAACAGGCC TTAACAGTGT  
             TGACTTAAAT TCTTTATCTA TCTGGCAGCA GTTATCCTG TATGGATTAA CTGCTATTAC  
             GGTTCTATA TGGATGCAAG GAAAGTATTTC CTTCATCCGG CTGTATTGGT TTGACGAAA  
 35       ATTTAAAGAC GTTGGTCGTC AAAATCGTAC TCGAAAATT CAGAGAAAGC TCCGTAAAAG  
             CTTAATGAAA AAAAGCGAGG ATGACGAAGA ACAGGGTGT CGTGGTAGAA AAATTCTGTGT  
             AATGTTACCA TACCTACATT CACTAAGGAG TCCAACGTCT CTAAAAAAACT TCTCGAGATT  
             TGACACGCAT GACAGTACGA ACAATCCGTA CTTTCCGTAC AACCCCCCTT CTCCCAAGGC  
 40       AGATATATCT AAAGACGAGT ATTTTGGAAA GTATCTCCC AAAAAGTCTG ATACGCTAGA  
             CATGGATTG GAAAGTCACA ACATGACTTT TCATGACTAT GAACCTTCCA TTGAAAATAA  
             AAATTACGAT TTTGGTAGTT CGCATTTCAGC CTCGATGCAA ATGTATGAAA TGGATGACCT  
             TCATCCCCGA CTTCGTAGAC AAAGCTCTT TATTCCTCC GTTAATCCTT TAGAGGCTGA  
 45       CTACACCGT GAAAATTAT CTGAAGGCAG CTTAGTTCACTAGTCTCC CTATGGCTTA  
             TAGTTATTCT GATACTAATT TGGTTGTATC GAGGGATTCA TTTACTCTCA CTGGGGACGA  
             CAATCTTTG CCAGAAGGTG GTTAAGGCC TGCCAATACA ATAGACGGAA TAGTAAGGTC  
             GTCTCTGTCT TCTTCCCTCC TATCTAAAGA CACTGAACCA TCGACAGTTG ACATGCATAT  
             TGCTTCACC GGACTTAATA AGCCCACCAT AGAGCGTGA CGTAATCTTA AACTAAGAAA  
 50       AAAAAGTCGT TTTTATAAAA AATCTTTACG TTCCAGATT TCGCGAGGAC TTCATCGTCC  
             AATACGTTGG ACAAAAGTCAT TCACCTCTAA CCGACGAAAC TTGACTCTG AACGAGTCCT  
             TTCTTCTGCC TTTGCTAAA AACATGAGCC TTCTATTCA TCAAGACACA CTACTATGTC  
             ACTTCCCTAT TTGTCGTATA ATCCTACTGT CGATCGTAAT TCTGCTTTCG TTGCTTTGTC  
             TAAAGAACAG CGGGACGAGC TGGGTGGAAT TGAATATAGA GCTTTGAAAT GCGTCTGCTC

55

60

65

CATGGTTATC CTTTATTTA TCATTTTAA TATTGCTGCC TTTGTGACCT TCATTGTTT  
TGCTTATACG GCAGTGGGAT CGCGAGAGGT AATAGATTCT TATGACTTAC GTCGTGGGTG  
GTGGCGTTA TTCTCGTCTG CTTCTTCATT TAATGATTG GGGTTTCTT TAATACCATC  
GTCTTTGTG CCAATGAATC GAAACATTTC TCTTTGTTG ATTCATCTT TATTCAATTAT  
CGCAGGTAAC ACGGGATTCC CTTGTTTTT TAGAACATTC ATTTGGACAA CGTATAAGCT  
ATACCCTTT AGTTTGAGA AGAAAAGAAGC TATGGCATTT CTCCCTGATC ATCCTCGACG  
ATGTTCACT TTATTGTTTC CATCTGGAGC AACCTGGTC TTGTTTTTG TTTGCTGCT  
GCTTAATGTC ATTGATCTGG TATTGTTCAT GGTCTTAGAT ACTGGAAGTA AAGCAGTCGC  
TAGCCTTCCT AAAGGTATTA GGGTTGAAA TGCAATATT CAATCAGTT GTACAAGAAC  
CGCAGGATTAC ACGAGTGTAT CAATTAGTGA ACTTCACCCA GCAGTACTGG TCAGTTACAT  
GGTTATGATG TATATTCTG TTTATCCAGT TGCTATCAAC ATGAGAAATA CCAATGTTA  
TGAGGAGCGA TCTTGGGTG TTTACAGAAC TGAAGATGAT GAGGGGAAAT CTTCTTAAA  
AGATCACCTT ACTGAACAAT TAAGTTACGA TTTATGGTAT ATTTTCTAG GGCTATTCA  
CATATGCATT TGTGAAGGAG GTAAAATCTC CAATCCTCTA GATACCGATT TCAGTATTT  
TACTGTCCTT TTTGAAGTAG TCTCTGCTTA CGGTACGGTG GGACTTAGTA CTGGATTAAAG  
CTCCTCAAAT TGTTCACTT CAGCAAGATT TACTACTATA AGTAAACTAG TTATTATAGC  
ACTTGAAC TGCGGTAGAC ATAGAGGTTT ACCCAGGGCT GTTGTACGAG CCATCCTCT  
TCCCTCTGAA AAAATAATC TGAAAGAAGA AGAAGATTAT CAACGTCGTC ACGGATTTTC  
CATAGACAAC GCACGTGGCA GTATTGCAGT TTCTCGAGAC TGATATTCT TATCACGATC  
ATGTATTATA TTTGTAATT ATATCATCTA ATAAATAGTA CTCCGCTAAA TTTCATACTC  
CTGATCGATA CACCGTTGT CCGCCATTTC TGAGTTGAAT TGTTCTTC GACGAAAGAA  
TTTGTAAGC CATTCTA

5

10

15

20

25

## 3. Information zur SEQ ID NO.2

## a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 841 Aminosäuereste
2. Typ: Aminosäure
3. Strang: kodicrend
4. Topologie: linear

30

35

## b) Molekültyp: Protein

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.2

FT CDS 302..2803  
FT /NOTE="NCBI GI: 550526"  
FT /CODON\_START=1  
FT /PRODUCT="K+ TRANSPORTER HOMOLOGUE"  
FT /DB\_XREF="PID:G550526"  
FT /DB\_XREF="SWISS-PROT:P47946"  
FT /TRANSLATION="MVQVGDTNFWIQGNNSLYLHISLTIIASVLLFTGGTTKIK  
FLASSATTQTGLNSVDLNSLSIWQQFILYFTAIVPIWMHGSISFIRLYWFRR  
VRQRNRTRKFQRKLRKSLMKKSEDDDEEQGVGRKRIRVMLPYLHSILRSPTSLKNFS  
DSTNNPYFPDNPPSPKADISKDEYFGKYLPKKSDTLDMDLESHNMTFHDYEPSI  
DFGSSHSASMQMYEMDDLHPRLRRQSSFISSVNPLEADYTRETLSSEGALVQESL  
YSDTNLVVSRDSFTLTGDDNLPEGGLRPANTIDGIVRSSLSSSSLKDTEPST  
AFTGLNKPTIERERNLKLRRKKSRYKKSLRSRFSRGHLRPIRWTKSFTSNRRNL  
LSSAFAKKHEPSISSRHTTMSLPYLSYNPTVDRNSAFVALSKERDELGGIEYR  
CSMVILYFIIFNIAAFVTIFIVFAYTAVGSREVIDSYDLRRGWALFSSASFND  
IPSSFVPMNRNIFLLISLFIAGNTGFPFFRTFIWTTYKLYPFSFEKKEAM  
HPRRCFTLLFPGATWVLFFVLLLNVIDLVLFMVLDTGSKAVASLPKGIRVNV  
VCTRTAGFTSVSISELHPAVLVSYMVMMMYISVYPVAINMRNTNVYEERSLGVYR  
GKSFLKDHLTEQLSYDLWYIFLGLFIICICEGGKISNPLDTSIFTVLFEVVS  
GLSTGLSSSNCSLSARFTTISKLVIIALELGRGRHRLPRAVVRAILLPSEKNNL  
YQRRHGFSIDNARGSIAVSRD"

40

45

50

55

60

65

## 4. Information zur SEQ ID NO.3

## a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 2806 Basenpaare
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: Einzelstrang
4. Topologie: linear

## b) Molekültyp: cDNS

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.3

ID	SPTRK2	PRELIMINARY; DNA; 2806 BP.
SQ	SEQUENCE	2806 BP; 828 A; 550 C; 540 G; 888 T; 0 OTHER;
15	ATACAGATT	TATCATGCAG TTATCGGGTT TTTCTACAAA CGGTTCCGGT TCCTTGAATA
	CCATTGTATG	TGAAAAACTT CTTTCAAGC CTAACCTTGT TCAAGATTCT TTTATAATAG
	GAATGACTAT	TTTATGTTCA GTAATATTGT ATGGGTCGGG AAATTGCGC TACATAGATG
20	CTTTGTTGTT	GGCTTCTGGT TCTGTACTC AGACTGGCTT GCAGCCTGTG GACCTCACGC
	AGATATCCAT	TTACCAACAG TAACTATTTC TCCTTTTGG AGTTTGAGT ACACCAATTA
	CTGTGAACCT	GGGCTTGACT TTGTTAACG TGTACTCTA TAACAAGCGA TATGACATGG
	TCATAACAAA	TAATAAACTT AGGATGACAT ATACTTATCA CACTGTAAGA AGAAGGGATA
25	CTCCAGAGCC	TTCCAAAGTT GGCAATCGAA AAATTGGGT TTTGTTAGAC CAGGTAATC
	AAATGCACCG	GCCAGTTGCC CCAGAGACTA AGGCTGAGGA AGCTGAACAC CAAGAGAATG
	AAAAACATCA	CAGGCACCAT TTTGTCCTAA GGAAATTGTC TAATGCAATC GATGCCCAA
	GCTTCTTCG	CGGGAAATACC ATGCCCGCTC TCCCTAGTTA TGCAAGGTGTT AGAAATTCTC
	AAGAAAATGA	AGACAGAACT GAAGCATTAA GTCCAGCTCT TGGGAAACGA AGAATGGCAT
30	CAATCGACAA	TGGATCTTA TCCGTTGTAC AAAACAATGC TAGAAATAAT CCTGTCGACT
	TTTACATTCC	TAGTTCGTT GAAGAATCAT CTTTCTAAC AATTCTGAG GATTTGAGC
	CTCAAGTACA	TGACCAACGAG AATCAAACAC AACTGAACCA TCATCTGGAT AACAAACAGTT
	CTATCTCTTC	GCACAATCCT TCCCTAGAAA CTGCAAATGA TGGAATTCAG GAAACTGTTT
	CATCTCTAAA	CTCAAACATAC AGCACAACAA GAGTTGACAA TGATCCACAT GTAGCATCTT
35	ATTCACCTCA	AAATTGCAAT TTTGATCATC AGGCTGCTGC AACTACTAAC GATGACACATC
	AAAATGTAGT	ACGCGGCTCT GCAATTACCA TTGCACCAAC CCCTGTTCCC AGGCATAATC
	GCAGGCCTAT	ATATTTGCT GATGACACGA ATGGAGCTGA GCAGGAAAAA GGTGCTCATC
	GACTTGATGG	ACGAGGTTAGA AACGTGGTA AATCATTG TGTTACACCT ACACCTCACAC
40	GGAATGAGCG	CTCAATGTCT GTCCTACCAT TTCAATTAGC CAAATCATT ACATCTGCTC
	TTCCCTCGAAG	ACTCACATTC AACCGTACTC ACACGAAAGC TAGCACAATG AGTTTACCTT
	ATTTATCGTA	CAATGCAACA GTGGGCAGAA ATTCTGCATT TTATGCTTA ACTCCAGTGG
	AGAGAGAAGA	ATTGGCGGGA ATTGAATATG AATCTCTCAG GATATTGACT GTCATATTAG
	TGGTTTATT	TCTGTTTGG CATATTCTT GTTTGGTTGC GTTCTAATA TTCATTATA
45	CTGCTAAAAC	ATCCGGTCGT GTAGTTACGG ACGGCGGTAT AAATAGAGGC TGGTGGCAG
	CGTTTACTTC	TAGTTGCTG TTTGATAATC TAGGCTATTG GTTGAACAGC GATTCTTAA
	ATTCTCTTCA	AAAAGCCATA TTTCCTCAGG TTCTTGGAAC TATTCTGATA TTTTTAGGGA
	ATACCTTCTT	TCCAATTATG CTCCGGTTA TAATTGGAT TATGATACGA ACAACGAGAT
50	TTTCCGCTAA	TTTCCAGCAA GCTTTGTACT TTCTTTTCA ACACCCCTCGA CGAAGTTTA
	CTCTTCTGTT	TCCTTCAAAA ACTACTGGG TGCTTTTTT AAATTTAATC TTATTGAATT
	TTGCTTCCCTT	TTCTTTTTT ATGGTTTAG ACTTGGGTAA TTCATATGTT GACAAAATTC
	CAGTTGGTTA	TCGAATTATG AATGCTATAT TTCAAAACGC AGCTACACGT TCTGCTGGCT
55	TTACGGTGGT	TGATTTAACG CAAATTGCTC CGGCAGTAAT GTGACCTAC ATGTTTATGA
	TGTATATCTC	TGCCTATCCA ATCGCAATGA GTATTGACA AACTATGTT TACGAGGAAC
	GTTCTCTTGG	AATATATGCA CGAGACACCG AAAATGATGA TGATAATAAT ATTAATAATA
	ATAATAATGA	TAATAATACG CCGAAAAGGA AAAATTGTTT GATGGACCAT ATACAAAGGC
	AACTGAGTCA	CGATTTGTGG TATTTATTCC TAGGCTACTT CATAATTACT ATAGTCGAAG
60	GTCGTCGATT	AGAGTCGGAA CGGGAACCGC AATTACGCT TTTTGTATT TTATTGAGG
	TGATTTCAAGG	CTATGGCACT GTGGGCCTAA GCTTAGGGTA CAAAAATGAT CCTTCGCTTA
	CGGCTCAGTT	CGGGAAAATT AGCAAACTTG TTATGGTTGC ACTACAGATT CGTGGACGAC
	ATAGAGGACT	TCCAAGTGCA TTAGATAGAG CAGTGTAAAT GCCTTCGGAT AAAAACTTTG
	ACCGGGAAAGA	AGAGGATTAT ATGAGACGTC ACGGGAAAAA AAATACTAAT AGAGCAGACC
65	CGGTACCCAG	TTCTTAATGA TTATAACCTC ACGGTTGATT AGACTTACCT TCTATGAAAA
	TGCAAGGCAA	GGTCAGGAGC TAATGAAAAT TGTACTGTAT CTTCTGGTTC TGTGCCATT
	TAACTGATTG	GGCCTTAAAAA GAACCTTTG TTTTATTATA TTTTAC

## 5. Information zur SEQ ID NO.4

## a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 880 Aminosäurereste
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: kodierend
4. Topologie: linear

## b) Molekültyp: Protein

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.4

ID SPTRK2 PRELIMINARY; PRT; 880 AA.  
 DT 01-NOV-1997 (CREATED BY PC/GENE PROGRAM TRANSL)  
 DE SCH POMBE  
 OS SPTRK2 OHNE INTRONS  
 CC TRANSLATED FROM DNA SEQUENCE SPTRK2 (BASES 15 TO 2654).  
 SQ SEQUENCE 880 AA; 99848 MW; 3988070 CN;  
 MQLSGFSTNG SGSLNTIVCE KLLFKPNFVQ DSFIIGMTIL CSVILYSGSN LRYIDALLLA  
 SGSCTQTGLQ PVDLTQISIY QQLTILLFGV LSTPITVNLG LTLFKLYFYN KRYDMVITNN  
 KLRMPTYTYHT VRRRDTPEPS KVGNRKIRVL LDQGNQMHRP VAPETKAEEA EHQEKEKHH  
 HHFRLRKFAN AIDRPSFFRG NTMPALPSYA GVRNSQENED RTEALSPALG KRRMASIDNG  
 SLSVVQNNAR NNPVDFYIPS SFEESSFQTI PEDFEPQVHD HENQTQLNHH LDNNSSSISSH  
 NPSLETANDG NQETVSSNS NYSTTRVDND PHVASYSPQN SNFDHQAAAT TNDAHQNVVR  
 GSATIATPTP VPRHNRPIY FADDTNGAEQ EKGAAHRLDGR GRKRGKSFAV TPTLHRNERS  
 MSVLPFQLAK SFTSALPTRL TFNRRTHTKAS TMSLPYLSYN ATVGRNSAFY ALTPVEREEL  
 AGIEYESLRI LTIVLVVYFL FWHLGLVAF LIFIYTAKTS GRVVTDGGIN RGWWAAFTSS  
 SLFDNLGYSL NSDSLNSFQK AIFPVQLGTI LIFLGNTFFF IMLRFIIWIM IRTTRFSPNF  
 QQALYFLFEH PRRSFTLLFP SKTTWVLFLN LTLLNFASFF FFMVLDLGNS YVDKIPVGYR  
 IMNAIFQNA TRSAGFTVVD LSQIAPAVMV TYMFMMYISA YPIAMSIRQT NVYEERSLGI  
 YAADTENDDD NNINNNNNNDN NTPKRKNFLM DHIQRQLSHD LWYLFLGYFI ITIVEGRRLE  
 SEAEPQFTLF AILFEVISGY GTVGLSLGYK NDPSLTAQFR KISKLVMVAL QIRGRHRGLP  
 SALDRAVLMP SDKNFDREEEE DYMRRHGKKN TNRADPVPSS

## 6. Information zur SEQ ID NO.5

## a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 4070 Basenpaare
2. Typ: Nukleinsäure
3. Strang: Einzelstrang
4. Topologie: linear

## b) Molekültyp: cDNS

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.5

SQ SEQUENCE 4070 BP; 713 A; 1413 C; 1255 G; 689 T;  
 ACGCGGCCTG CTCAGGCCTC CAGCGGCCGG TCGGAGGGGA GGCGGGAGGC GAGCGAGGAC  
 CCGCGCCCGC AGTCCAGTCT GTGCGCGCCC GTGCTCGCTT GGCGCGGTGC GGGACCAGCG  
 CCGGCCACCC GAAGCTTAGT GCGTCGCCGG GTGGGTGGGC CCGCCCGCGC CCATGGGCTC  
 AGGATGCCGG TGCGGAGGGG CCACGTCGCG CCGCAGAACCA CCTTCCTGGA CACCATCATC  
 CGCAAGTTTG AGGGCCAGAG CCGTAAGTTC ATCATCGCCA ACGCTCGGGT GGAGAACTGC  
 GCCGTCACTC ACTGCAACGA CGGCTCTGCG GAGCTGTGCG GCTACTCGCG GGCGGAGGTG  
 ATGCAGCGAC CCTGCACCTG CGACTTCTG CACGGCCGC GCACGCAGCG CGCGCCTGCC  
 GCGCAGATCG CGCAGGCCT GCTGGCGCC GAGGAGCGCA AAGTGGAAAT CGCCTCTAC  
 CGGAAAGATG GGAGCTGCTT CCTATGTCTG GTGGATGTGG TGCCCGTGAA GAACGAGGAT  
 GGGGCTGTCA TCATGTTCAT CCTCAATTTC GAGGTGGTGA TGGAGAAAGGA CATGGTGGGG  
 TCCCCGGCTC ATGACACCAA CCACCGGGGC CCCCCCACCA GCTGGCTGGC CCCAGGCCGC  
 GCCAAGACCT TCCGCTGAA GCTGCCCGCG CTGCTGGCGC TGACGGCCCG GGAGTCGTCG  
 GTGCGGTGCG GCGGCCGGGG CGGCGCGGGC GCCCCGGGGG CGTGGTGGT GGACGTGGAC  
 CTGACGCCCG CGGCACCCAG CAGCGAGTCG CTGGCCCTGG ACGAAGTGCAC AGCCATGGAC  
 AACCACGTGG CAGGGCTCGG GCCCCGGAG GAGCGCGTG CGCTGGTGGG TCCCGCTCT  
 CCGCCCCGCA GCGCGCCCGG CGAGCTCCCA TCGCCCCGGG CGCACAGCCT CAACCCCCGAC

GCCTCGGGCT CCAGCTGCAG CCTGGCCGG ACACGCTCCC GAGAAAGCTG CGCCAGCGTG  
 CGCCGCGCCT CGTCGGCGA CGACATCGAG GCCATCGCG CGGGGGTGTGCT GCCCCCCGCCA  
 CCGCGCCACG CCAGCACCGG GGCCATGCAC CCACATCGCA GCGGTTGCT CAACTCCACC  
 5 TCGGACTCCG ACCTCGTGC CTACCGCACC ATTAGCAAGA TTCCCCAAAT CACCCCTAAC  
 TTTGTGGACC TCAAGGGCGA CCCCTTCTTG GCTTCGCCC CAAGTGACCG TGAGATCATA  
 GCACCTAAGA TAAAGGAGCG AACCCACAAT GTCACTGAGA AGGTCACCCA GGTCTGTCC  
 CTGGGCGCCG ACGTGCTGCC TGAGTACAAG CTGCAGGCAC CGCGCATCCA CCGCTGGACC  
 10 ATCCCTGCATT ACAGCCCCCT CAAGGCCGTG TGGGACTGGC TCATCCTGCT GCTGGTCATC  
 TACACGGCTG TCTTCACACC CTACTCGGCT GCCTTCCTGC TGAAGGAGAC GGAAGAAGGC  
 CCGCCTGCTA CCGAGTGTGG CTACGCCTGC CAGCCGCTGG CTGTGGGAA CCTCATCGT  
 GACATCATGT TCATTGTGGA CATCCTCATC AACTTCCGCA CCACCTACGT CAATGCCAAC  
 GAGGAGGTGG TCAGGCCACCC CGGCCGCATC GCCGTCACACT ACTTCAAGGG CTGGTTCTC  
 15 ATCGACATGG TGGCCGCCAT CCCCTTCGAC CTGCTCATCT TCGGCTCTGG CTCTGAGGAG  
 CTGATCGGGC TGCTGAAGAC TGCGCGGTG CTGCGGCTGG TGCGCGTGGC GCGGAAGCTG  
 GATCGCTACT CAGAGTACGG CGCGGCCGTG CTGTTCTTG TCATGTGCAC CTTTGCCTC  
 ATCGCGCACT GGCTAGCCTG CATCTGGTAC GCCATCGGCA ACATGGAGCA GCCACACATG  
 20 GACTCACGCA TCGGCTGGCT GCACAACTG GGCGACCAGA TAGGCAAACC CTACAACAGC  
 AGCGGCCCTGG GCGGCCCTC CATCAAGGAC AAGTATGTGA CGGCGCTCTA CTTCACCTTC  
 AGCAGCCTCA CCAGTGTGGG CTTCGGCAAC GTCTCTCCA ACACCAAAC AGAGAAGATC  
 TTCTCCATCT GCGTCATGCT CATTGGCTCC CTCATGTATG CTAGCATCTT CGGCAACGTG  
 TCGGCCATCA TCCAGCGGCT GTACTCGGGC ACAGCCCGCT ACCACACACA GATGCTGCGG  
 25 GTGCGGGAGT TCATCCGCTT CCACCAAGATC CCCAATCCCC TGCGCCAGCG CCTCGAGGAG  
 TACTTCCAGC ACGCTGGTC CTACACCAAC GGCACTGACA TGAACCGGGT GCTGAAGGGC  
 TTCCCTGAGT GCCTGCAGGC TGACATCTGC CTGCACCTGA ACCGCTCACT GCTGCAGCAC  
 TGCAAACACCT TCCGAGGGC CACCAAGGGC TGCCCTCGGG CCCTGGCAT GAAGTTCAAG  
 30 ACCACACATG CACCGCCAGG GGACACACTG GTGCATGCTG GGGACCTGCT CACCGCCCTG  
 TACTTCATCT CCCGGGGCTC CATCGAGATC CTGCGGGCG ACGTCGTGCT GGGCATCCTG  
 GGGAAAGATG ACATCTTGG GGAGCCTCTG AACCTGTATG CAAGGCTTGG CAAGTCGAAC  
 GGGGATGTGC GGGCCCTCAC CTACTGTGAC CTACACAAGA TCCATGGGA CGACCTGCTG  
 GAGGTGCTGG ACATGTACCC TGAGTTCTCC GACCACTTCT GGTCCAGCCT GGAGATCACC  
 35 TTCAACCTGC GAGATACCAA CATGATCCCC GGCTCCCCCG GCAGTACGGA GTTAGAGGGT  
 GGCTTCAGTC GGCAACGAA GCGCAAGTTG TCCTTCGCA GGCGCACCGA CAAGGACACCG  
 GAGCAGCCAG GGGAGGTGTC GGCCCTGGGG CGGGGCCGGG CGGGGGCAGG GCCGAGTAGC  
 CGGGGCCGGC CGGGGGGGCC GTGGGGGGAG AGCCCGTCCA GTGGCCCTC CAGCCCTGAG  
 40 AGCAGTGAGG ATGAGGGCCC AGGCCGCAGC TCCAGCCCC TCCGCTCTGGT GCCCTTCTCC  
 AGCCCCAGGC CCCCCGGAGA GCCGCCGGGT GGGGAGCCCC TGATGGAGGA CTGCGAGAAC  
 AGCAGCGACA CTTGCAACCC CCTGTCAGGC GCCTTCTCAG GAGTGTCAA CATTTCAGC  
 TTCTGGGGGG ACAGTCGGG CCGCCAGTAC CAGGAGCTCC CTCGATGCC CGCCCCCACC  
 CCCAGCCTCC TCAACATCCC CCTCTCCAGC CGGGTCTGGC GGCCCCGGGG CGACGTGGAG  
 45 AGCAGGCTGG ATGCCCTCCA GCGCCAGCTC AACAGGCTGG AGACCCGGCT GAGTGCAGAC  
 ATGGCCACTG TCCTGCAGCT GCTACAGAGG CAGATGACGC TGGTCCCGCC CGCCTACAGT  
 GCTGTGACCA CCCCCGGGCC TGGCCCCACT TCCACATCCC CGCTGTTGCC CGTCAGCCCC  
 CTCCCCACCC TCACCTTGGA CTCGTTTCT CAGGTTTCCC AGTTCATGGC GTGTGAGGAG  
 50 CTGCCCCCGG GGGCCCCAGA GCTTCCCCAA GAAGGCCCCA CACGACCCCT CTCCCTACCG  
 GGCCAGCTGG GGGCCCTCAC CTCCCAGCCC CTGCACAGAC ACGGCTCGGA CCCGGGCAGT  
 TAGTGGGGCT GCCCCAGTGTG GACACGTGGC TCACCCAGGG ATCAAGGCGC TGCTGGCCG  
 CTCCCCCTGG AGGCCCTGCT CAGGAGGCC TGACCGTGGA AGGGGAGAGG AACTCGAAAG  
 CACAGCTCCT CCCCCAGCCC TTGGGACCAT CTTCTCTGC AGTCCCCCTGG GCCCCAGTGA  
 55 GAGGGGCAGG GGCAGGGCCG CGACTAGGTG GGGCCTGTGG TCCCCCCACT GCCCTGAGGG  
 CATTAGCTGG TCTAACTGCC CGGAGGCACC CGGGCCCTGGG CCTTAGGCAC CTCAGGACT  
 TTTCTGCTAT TTACTGCTCT TATTGTTAAG GATAATAATT AAGGATCATA TGAATAATT  
 ATGAAGATGC TGATGACTAT GAATAATAAA TAATTATCCT GAGGAGAAAA

60

65

## 7. Information zur SEQ ID NO.6

## a) Sequenzcharakteristika

1. Länge: 1159 Aminosäurereste
2. Typ: Aminosäure
3. Strang: kodierend
4. Topologie: linear

## b) Molekültyp: Protein

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.6

```

FT CDS 184..3663
FT /STANDARD_NAME="HUMAN EAG RELATED GENE"
FT /GENE="HERG"
FT /NOTE="NCBI GI: 487738"
FT /PRODUCT="PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT"
FT /CODON_START=1
FT
/TRANSLATION="MPVRRGHVAPQNTFLDTIIRKFEGQSRKFIIANARVENCAVIYC
FT NDGFCELCGYSRAEVMQRPCTCDFLHGPTQRRAAAQIAQALLGAEERKVEIAFYRKD
FT GSCFLCLVDVVPVKNEDGAVIMFILNFEVVMEKDMVGSPAHDTNHRGPPTSWLAGRA
FT KTFRLKLPALLALTARESSVRSGGAGGAGAPGAVVVVDVDLTPAAPSSESLALDEVTAM
FT DNHVAGLGPAAERRALVGPGSPPRSPAPGQLPSPRAHSNLNPDAAGSSCSLARTRSRESC
FT ASVRASSADDIEAMRAGVLPPPPRHASTGAMHPLRSGLLNSTSDSDLVRYRTISKIP
FT QITLNFVDLKGDPLASPTSDREIIAPKIKERTHNVTEKVTQVLSIGADVLPEYKLQA
FT PRIHRWTILHYSPFKAVWDWLILLIVIYTAVFTPYSAAFLLKETEEGPPATECGYACQ
FT PLAVVDLIVDIMFIVDILINFRTTYVNANEEVVSHPGRIAVHYFKGWFLIDMVAAIPF
FT DLLIFGSGSEELIGLLKTARLLRLVRVARKLDYSEYGAALFLLMCTFALIAHWLAC
FT IWYAIIGNMEQPHMDSRIGWLHNLDQIGKPYNSSGLGGPSIKDKYVTALYFTFSSLTS
FT VGFGNVSPNTNSEKIFSICVMLIGSLMYASIFGNVSAIIQRLYSGTARYHTQMLRVRE
FT FIRFHQIPNPLRQLREYFQHAWSYTNGIDMNAVLKGFPECLQADICLHLNRSSLQHC
FT KPFRGATKGCLRALAMKFTTHAPPGTLVHAGDLLTALYFISRGSIIEILRGDVVAI
FT LGKNDIFGEPLNLYARPGKNSNGDVRALTYCDLHKIHRRDDLEVLDMPPEFSDHFWSL
FT EITFNLRDTNMIPGSPGSTELEGGFSRQRKRKLSFRRRTDKDTEQPGEVSAALGPGRAG
FT AGPSSRGRPGGPWGESPSSGPSSPESSEDEGPGRSSSPRLVFPSSPRPPGEPPGEP
FT LMEDCEKSSDTCNPLSGAFSGVSNIFSFWGDSRGRQYQELPRCPAPTPSLLNIPLSSP
FT GRRPRGDVESRLDALQROLNRLETRLSADMATVLQLLQRQMTLVPPAYSAVTPGPGP
FT TSTSPLPVSPPLPTLTDLSQVSQFMACEELPPGAELPQEGPTRRLSLPGQLGALT
FT SQPLHRHGSDPGS"

```

## 8. Information zur SEQ ID NO.7

## a) Sequenzcharakteristika

5. Länge: 54 Basen
6. Typ: Nukleinsäure
7. Strang: Einzelstrang
8. Topologie: linear

## b) Molekültyp: Oligonukleotid

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.7

5' CAC GGA TCC ACA GAT TTT ATC ATG CAG TTA TCG GGT TTT TCT ACA AAC GGT TCC 3'

## 9. Information zur SEQ ID NO.8

## a) Sequenzcharakteristika

9. Länge: 20 Basen
10. Typ: Nukleinsäure
11. Strang: Einzelstrang
12. Topologie: linear

## b) Molekültyp: Oligonukleotid

## c) Sequenzbeschreibung SEQ ID NO.8

5' CGC GAA AGA AGC TTG GGC GA 3'

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Patentansprüche

1. Schizosaccharomyces pombe Mutanten mit Defekten in der Kaliumaufnahme die erhältlich sind durch Mutation der Kaliumtransporter TKHp und/oder Trk2p. Einführung einer oder mehrerer selektiver Marker (Auxotrophien und/oder Resistenzen).
2. Schizosaccharomyces pombe Mutanten tkh, trk2 und tkh trk2
3. Verwendung der Schizosaccharomyces pombe Mutanten nach Anspruch 1 oder 2 als Wirtsorganismus zur homologen oder heterologen Expression von Kaliumionen Kanälen.
4. Ein genetisch modifizierter Schizosaccharomyces pombe Hefestamm der die Nukleinsäuresequenz für das humane erg Kaliumionen-Kanal Gen (HERG) aber nicht die der Hefe eigenen Kaliumtransporter TKHp und Trk2p exprimiert.
5. Ein Verfahren zur Detektion spezifischer Modulatoren des HERG Kaliumionen-Kanals, einschließlich:
  - a) Die Behandlung des Schizosaccharomyces pombe Hefewirtsstamms, der die Nukleinsäuresequenz für den humanen erg Kaliumionen-Kanal (HERG) oder ein funktionelles Derivat oder eine Mutationsform dieses Kaliumionen-Kanals aber nicht die der Hefe eigenen TKHp oder Trk2 Kaliumionen-Transportproteine exprimiert mit Testsubstanzen.
  - b) Wachstumsbestimmungen in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
  - c) Messungen des Anstiegs oder der Abnahme des Kaliumtransports derjenigen Stämme in Anwesenheit oder nach Anwendung einer Testsubstanz.
6. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von anti-arrhythmische Substanzen.
7. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von antifibrillatorische Substanzen.
8. Ein Verfahren nach Anspruch 4 zur Detektion von anti-entzündlichen Substanzen.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

25

30

35

40

45

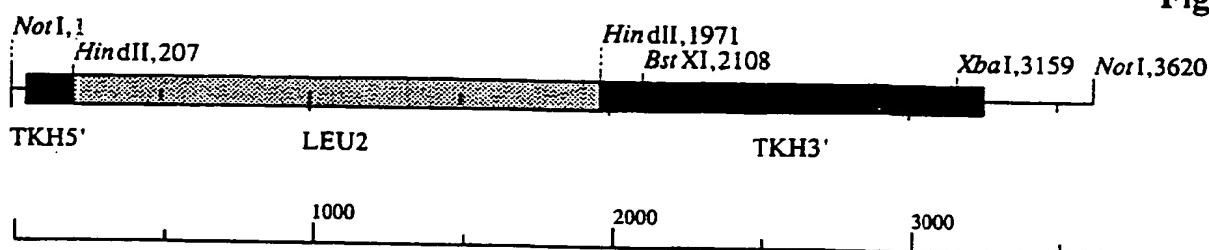
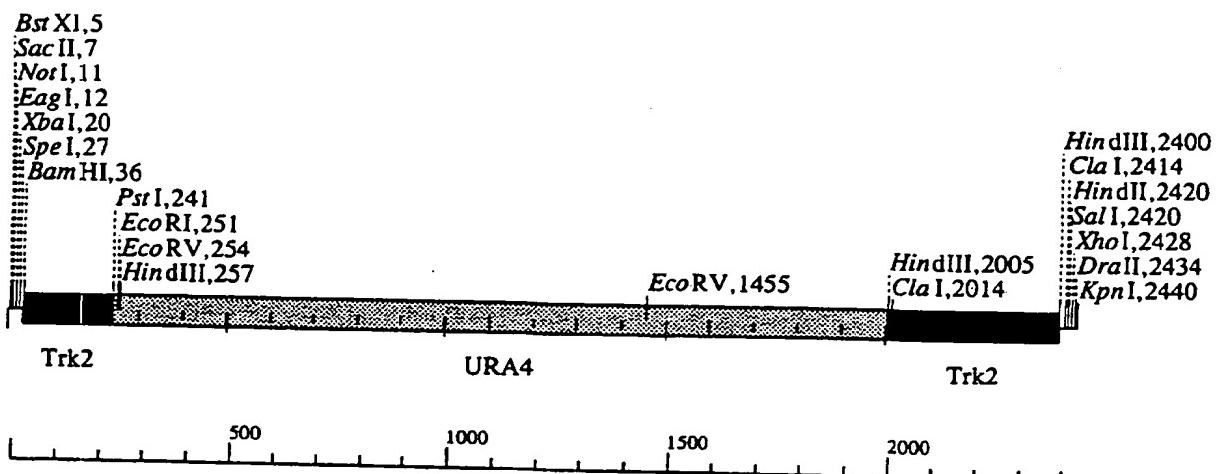
50

55

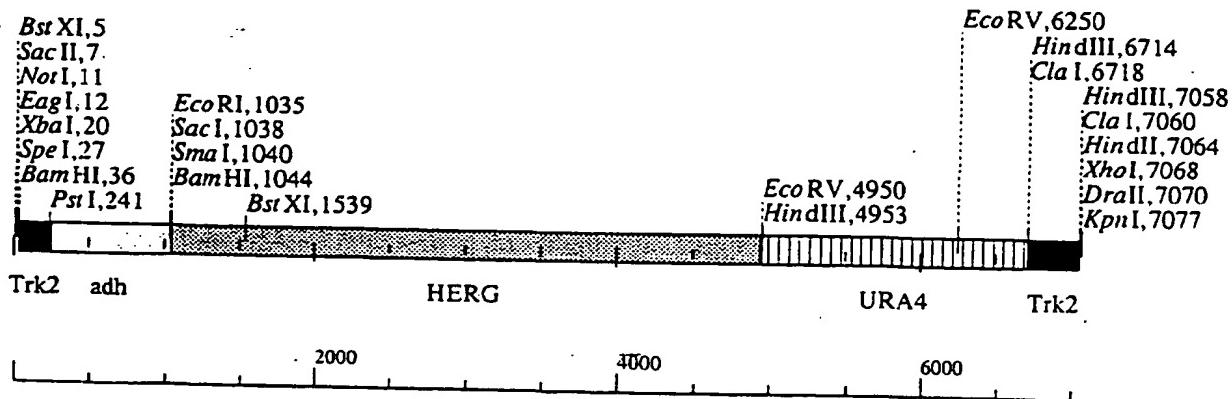
60

65

Fig. 1

Tk<sub>h</sub>::LEU2 (3620 bps)

Trk2::URA4 (2440 bps)



Trk2::adhHerg/Ura4 (7077 bps)

ID SPTRKH PRELIMINARY; DNA; 2958 BP.  
 AC L36563;  
 DT 01-OCT-1994 (REL. 41, CREATED)  
 DT 01-OCT-1995 (REL. 45, LAST UPDATED, VERSION 2)  
 DE SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE K+ TRANSPORTER TRK HOMOLOGUE GENE,  
 DE COMPLETE CDS.  
 KW K+ TRANSPORT PROTEIN.  
 OS SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE (YEAST)  
 OC EUKARYOTA; PLANTAE; THALLOBIONTA; EUMYCOTA; HEMIASCOMYCETES;  
 OC ENDOMYCETALES; SACCHAROMYCETACEAE.  
 RN [1]  
 RP 1-2958  
 RA SOLDATENKOV V.A., VELASCO J.A., AVILA M.A., DRITSCHILO A.,  
 RA NOTARIO V.;  
 RT "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SP TRK, A GENE FROM  
 RT SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE PREDICTED TO ENCODE A K+ TRANSPORTER  
 RT PROTEIN";  
 RL GENE 161:97-191 (1995).  
 DR SWISS-PROT; P47946; TRK\_SCHPO.  
 CC NCBI GI: 550525  
 FT SOURCE 1..2958  
 FT /ORGANISM="SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE"  
 FT /SEQUENCED\_MOL="DNA"  
 FT CDS 302..2803  
 FT /NOTE="NCBI GI: 550526"  
 FT /CODON\_START=1  
 FT /PRODUCT="K+ TRANSPORTER HOMOLOGUE"  
 FT /DB\_XREF="PID:G550526"  
 FT /DB\_XREF="SWISS-PROT:P47946"  
 FT /TRANSLATION="MVQVGDTNFWIQGNNSLYLHISLTIIASVLLFTGGTTKIK  
 FT FLOSSATTQTLGLNSVDLNSLSIWQQFILYGFTAITVPIWMHGSISFIRLYWFR  
 FT VRQRNRTRKFQRKLRKSLSMKKSEDDEEQGVGRKRKIRVMLPVLHSLRSPSLKNFS  
 FT DSTNNPYFPDNPPSPKADISKDEYFGKYLPKKSDTLDMDLESHNMTFHDYEPSI  
 FT DFGSSHSASMQMYEMDDLHPRLRRQSSFISSVNPLEADYTRETLSEGALVQESL  
 FT YSDTNLVVSRDSFTLTGDDNLPEGGLRPANTIDGIVRSSLSSSSLSKDTEPST  
 FT AFTGLNKPTIERERNLKLRLKKSRSFYKKSLRSRFSRGLHRPIRWTKSFTSNRRNL  
 FT LSSAFAKKHEPSISSRHTTMSLPYLISYNPTVDRNSAFVALSKERQDELGGIEYR  
 FT CSMVILYFIIFNIAAFVTFIVPAYTAVGSREVIDSYDLRRGWALFSSASSFND  
 FT IPSSFVPMNRNIFLLLISSLFIIAGNTGFPCFFRTFIWTTYKLYPFSFEKKEAM  
 FT HPRRCFTLLFPNGATWVLFVLLLNVIDLVLFMVLDTGSKAVASLPKGIRVWN  
 FT VCTRRTAGFTSVSISELHPAVLVSYMVMYISVYPVAINMRNTNVYEERSLGVYR  
 FT GKSFLKDHLTEQLSYDLWIIFLGLFIICICEGGKISNPPLTDTSIFTVLFEVVS  
 FT GLSTGLSSSNCSLSARFTTISKLVIALELRGRHRLPRAVVRAILLPSEKNNL  
 FT YQRHGFSDNARGSIAVSRD"  
 SQ SEQUENCE 2958 BP; 824 A; 577 C; 551 G; 1006 T; 0 OTHER;  
AAAGAAGACG CGATTTACG TTGTATTATA AGAGAGGAAT CCTCAA GTTGAAGG  
AATCGTCAAA GATTGGTAA AAATGTCGTT TGTCAATTGT CATAATTCCC TTTTAGAAT  
TTAGGGTT CCTCATCAGT ATCGCTTTA CCCGTAGATT TCAAAACTAA TTGCTTCCTA  
TCTTGTCAT AGTTAAGGAT TTCCGTTAAC TTCAAAACCAA TTTCTCTGTT TCTTGTTCTG  
TTGGTGGTGG GTTTGGCTGG AACTATTGAC TAAAATAAT GGTCTAAAT TACATTCAA  
GATGGTCAA GTGGGTGATA CCAACTTTG GATTCAAGGC AATTCAATT ATTACATAT  
ATCCTTAAT ATCATTGCCT CTGTCCTACT TTTTACCGGA GGGACCA CGAAAATCAA  
GTATATCGAT GCTTTATTCT TAGCTAGCAG CGCAACTACC CAAACAGGCC TTAACAGTGT  
TGACTTAAAT TCTTTATCTA TCTGGCAGCA GTTTATCTG TATGGATTAA CTGCTATTAC  
GGTTCTATA TGGATGCACG GAAGTATTC CTTCATCCGG CTGTATTGGT TTGACGAAA  
ATTTAAAGAC GTTGGTCGTCA AAAATCGTAC TCGAAAATTT CAGAGAAAGC TCCGTAAG  
CTTAATGAAA AAAAGCGAGG ATGACGAAGA ACAGGGTGT CGTGGTAGAA AAATTCGTGT  
AATGTTACCA TACCTACATT CACTAAGGAG TCCAACGTCT CTAAAAAACT TCTCGAGATT  
TGACACGCAT GACAGTAGCA ACAATCCGTA CTTTCTGAC AACCCCCCTT CTCCCAAGGC  
AGATATATCT AAAGACGAGT ATTTGGAAA GTATCTCCA AAAAAGTCTG ATACGCTAGA  
CATGGATTTG GAAAGTCACA ACATGACTTT TCATGACTAT GAACCTTCCA TTGAAAATAA  
AAATTACGAT TTTGGTAGTT CGCATTCCAGC CTCGATGCAA ATGTATGAAA TGGATGACCT  
TCATCCCCGA CTCGTAGAC AAAGCTCTT TATTCCTCC GTTAATCCTT TAGAGGCTGA

Fig.2A

CTACACCCGT GAAACTTTAT CTGAAGGCAG CTTAGTCAG GAATCTCTCC CTATGGCTTA  
 TAGTTATTCT GATACTAATT TGGTTGTATC GAGGGATTCA TTTACTCTCA CTGGGGACGA  
 CAACTTTTC CCAGAAGGTG GTTTAAGGCC TGCCAATACA ATAGACGGAA TAGTAAGGTC  
 GTCTCTGTCT TCTTCCCTCCC TATCTAAAGA CACTGAACCA TCGACAGTTG ACATGCATAT  
 TGCTTTCACCG GAGCTTAATA AGCCCCACCAT AGAGCGTGAA CGTAATCTTA AACTAAGAAA  
 AAAAGTCGT TTTTATAAAA AATCTTACG TTCCAGATT TCAGCAGGAC TTCATCGTCC  
 AATACGTTGG ACAAAAGTCAT TCACCTCTAA CCGACGAAAC TTGACTCTTG AACGAGTCCT  
 TTCTTCTGCC TTTGCTAAAA AACATGAGCC TTCTATTTC TCAAGACACA CTACTATGTC  
 ACTTCCCTAT TTGTCGTATA ATCCTACTGT CGATCGTAAT TCTGCTTTCG TTGCTTTGTC  
 TAAAGAACAG CGGGACGAGC TGGGTGGAAT TGAATATAGA GCTTTGAAAT GCGTCTGCTC  
 CATGGTTATC CTTTATTTTA TCATTTTAA TATTGCTGCC TTTGTGACCT TCATTGTTTT  
 TGCTTATAACG GCAGTGGGAT CGCGAGAGGT AATAGAATTCT TATGACTTAC GTCGTGGGTG  
 GTGGGCCTTA TTCTCGTCTG CTTCTTCATT TAATGATTG GGGTTTCTT TAATACCATC  
 GTCTTTGTC CCAATGAATC GAAACATTTC TCTTTGTTG ATTTCATCTT TATTCAATTAT  
 CGCAGGTAAC ACGGGATTCC CTTGTTTTT TAGAACATTC ATTTGGACAA CGTATAAGCT  
 ATACCCCTTT AGTTTGAGA AGAAAGAACG TATGGCATTTC CTCCTTGATC ATCCTCGACG  
 ATGTTTCACT TTATTGTTTC CATCTGGAGC AACCTGGGTC TTGTTTTG TTTGCTGCT  
 GCTTAATGTC ATTGATCTGG TATTGTCAT GGCTTAGAT ACTGGAAGTA AAGCAGTCGC  
 TAGCCTTCT AAAGGTATTA GGGTTGAAA TGAATATTTC CAATCAGTTT GTACAAGAAC  
 CGCAGGATTC ACGAGTGTAT CAATTAGTGA ACTTCACCCA GCAGTACTGG TCAGTTACAT  
 GGTTATGATG TATATTCTG TTTATCAGT TGCTATCAAC ATGAGAAATA CCAATGTTA  
 TGAGGAGCGA TCTTGGGTG TTTACAGAAC TGAAGATGAT GAGGGAAAT CTTTCTTAAA  
 AGATCACCTT ACTGAACAAAT TAAGTTACGA TTATGTTAT ATTTTCTAG GGCTATTCA  
 CATATGCATT TGTAAGGAG GTAAAATCTC CAATCCTCTA GATACCGATT TCAGTATT  
 TACTGTCTT TTTGAAGTAG TCTCTGCTTA CGGTACGGTG GGACTTAGTA CTGGATTAAG  
 CTCCTCAAAT TGTCACCTT CAGCAAGATT TACTACTATA AGTAAACTAG TTATTATAGC  
 ACTTGAAC TG CGGGTAGAC ATAGAGGTT ACCCAGGGCT GTTGTACGAG CCATCCTTCT  
 TCCTTCTGAA AAAATAATC TGAAAGAAGA AGAAGATTAT CAACGTCGTC ACGGATTTTC  
 CATAGACAAAC GCACGTGGCA GTATTGCAGT TTCTCGAGAC TGATATTCT TATCACGATC  
 ATGTATTATA TTTGTAATT ATATCATCTA ATAAATAGTA CTCCGCTAAA TTCATAC  
 CTGATCGATA CACCGTTGT CCGCCATTTC TGAGTTGAAT TGTTCCCTC GACGAAAGAA  
 TTTGTAAAGC CATTCTA

Fig.2B

ID SPTRK2 PRELIMINARY; PRT; 880 AA.  
 DT 01-NOV-1997 (CREATED BY PC/GENE PROGRAM TRANSL)  
 DE SCH POMBE  
 OS SPTRK2 OHNE INTRONS  
 CC TRANSLATED FROM DNA SEQUENCE SPTRK2 (BASES 15 TO 2654).  
 SQ SEQUENCE 880 AA; 99848 MW; 3988070 CN;  
 MQLSGFSTNG SGSLNTIVCE KLLFKPNFVQ DSFIIGMTIL CSVILYGSQN LRYIDALLA  
 SGSCTQTGLQ PVDLTQISIY QQLTILLFGV LSTPITVN LG LTLLFKLYFYN KRYDMVITNN  
 KLRMITYTYHT VRRRDTPEPS KVGNRKIRVL LDQGNQMHRP VAPEAKAEEA EHQUEEKHHR  
 HHFLRLRKFAN AIDRPSFFRG NTMPALPSYA GVRNSQENED RTEALSPALG KRRMASIDNG  
 SLSVVQNNAR NNPVDFYIPS SFEESSFQTI PEDFEPVQHD HENQTLNHH LDNNSSISSH  
 NPSLETANDG NQETVSSNS NYSTTRVDND PHVASYSQN SNFDHQAAAT TNDAHQNVVR  
 GSAITIAPTP VPRHNRRPIY FADDTNGAEQ EKGKAHLRDGR GRKRGKSFAV TPTLHRNERS  
 MSVLPFQLAK SFTSALPRL TFNRTHTKAS TMSLPYLSYN ATVGRNSAFY ALTPVEREEL  
 AGIEYESLRI LTIVLUVYFL FWHLGLVAF LIFIYTAKTS GRVVTDGGIN RGWWAAFTSS  
 SLFDNLGYSL NSDSLNSFQK AIFPQVLGTI LIFLGNTFFF IMLRFIIWIM IRTTRFSPNF  
 QQALYFLFEH PRRSFTLLFP SKTTWVLFLN LTLLNFASFF FFMVLDLGN S YVDKIPVGYR  
 IMNAIFQNAA TRSAGFTVVD LSQIAPAVMV TYMFMMYISA YPIAMSIRQT NVYEERSILGI  
 YAADTENDDD NNINNNNNNDN NTPKRKNFLM DHIQRQLSHD LWYLFGLYFI ITIVEGRRL  
 SEAEPQFTLF AILFEVISGY GTVGLSLGYK NDPSLTAQFR KISKLVMDVAL QIRGRHRLP  
 SALDRAVLMP SDKNFDREEE DYMRMRHGKKN TNRADPVPS  
 //  
 ID SPTRK2 PRELIMINARY; DNA; 2806 BP.  
 SQ SEQUENCE 2806 BP; 828 A; 550 C; 540 G; 888 T; 0 OTHER;  
 ATACAGATT TATCATGCAG TTATCGGGTT TTTCTACAAA CGGTTCCGGT TCCTTGAATA  
 CCATTGTATG TGAAAACCTT CTTTCAGG CTAACCTTGT TCAAGATTCT TTTATAATAG  
 GAATGACTAT TTTATGTTCA GTAATATTGT ATGGGTCGGG AAATTGCGC TACATAGATG  
 CTTTGTGTT GGCTTCTGGT TCTTGACTC AGACTGGCTT GCAGGCTGTG GACCTCACGC  
AGATATCCAT TTACCAACAG TTAACATTTC TCCTTTTGG AGTTTGAGT ACACCAATTA  
 CTGTGAACCTT GGGCTTGACT TTGTTTAAGC TGTACTTCTA TAACAAGCGA TATGACATGG  
 TCATAACAAA TAATAAACCTT AGGATGACAT ATACTTATCA CACTGTAAGA AGAAGGGATA  
 CTCCAGAGCC TTCCAAAGTT GGCAATCGAA AAATTGGGGT TTTGTTAGAC CAGGGTAATC  
 AAATGCACCG GCCAGTTGCC CCAGAGACTA AGGCTGAGGA AGCTGAACAC CAAGAGAATG  
 AAAAACATCA CAGGCACCAT TTTCGTCTAA GGAAATTGGC TAATGCAATC GATGCCCAA  
 GCTTCTTCG CGGGAAATACC ATGCCCGCTC TCCCTAGTTA TGCAGGTGTT AGAAATTCTC  
 AAGAAAATGA AGACAGAACT GAAGCATTAA GTCCAGCTCT TGGGAAACGA AGAATGGCAT  
 CAATCGACAA TGGATCTTTA TCCGGTGTAC AAAACAATGC TAGAAATAAT CCTGTCGACT  
 TTTACATTCC TAGTTGTTT GAAGAATCAT CTTTCAAAAC AATTCTGAG GATTTGAGC  
 CTCAAGTACA TGACCACGAG AATCAAACAC AACTGAACCA TCATCTGGAT AACAAACAGTT  
 CTATCTCTC GCACAATCCT TCCCTAGAAA CTGCAAATGA TGGTAATCAG GAAACTGTTT  
 CATCCTCAAA CTCAAACATC AGCACAACAA GAGTTGACAA TGATCCACAT GTAGCATCTT  
 ATTACACCTCA AAATTCGAAT TTTGATCATC AGGCTGCTGC AACTACTAAC GATGCACATC  
 AAAATGTAGT ACGCGGCTCT GCAATTACCA TTGCACCAAC CCCTGTTCCC AGGCATAATC  
 GCAGGGCTAT ATATTTTGCT GATGACACGA ATGGAGCTGA GCAGGAAAAA GGTGCTCATC  
 GACTTGATGG ACGAGGTTAGA AAACGTGGTA AATCATTGC TGTTACACCT ACACCTCACA  
 GGAATGAGCG CTCATGTCT GTCTTACCAT TTCAATTAGC CAAATCATT ACATCTGCTC  
 TTCTCGAAG ACTCACATT AACCCTACTC ACACGAAAGC TAGCACAATG AGTTTACCTT  
 ATTTATCGTA CAATGCAACA GTGGGCAGAA ATTCTGCATT TTATGCCCTA ACTCCAGTGG  
 AGAGAGAAGA ATTGGCGGGA ATTGAATATG AATCTCTCAG GATATTGACT GTCATATTAG  
 TGGTTATTT TCTGTTTGG CATATTCTTG GTTGGTTGC GTTCTTAATA TTCATTATA  
 CTGCTAAAC ATCCGGTCTG GTAGTACGG ACGGCGGTAT AAATAGAGGC TGGTGGCAG  
 CGTTTACTTC TAGTTGCTG TTTGATAATC TAGGCTATTG GTTGAACAGC GATTCTTAA  
 ATTCCCTTC AAAAGCCATA TTTCCCTCAGG TTCTTGGAAC TATTCTGATA TTTTTAGGGA  
 ATACTTCTT TCCAATTATG CTCCGGTTA TAATTTGGAT TATGATACGA ACAACGAGAT  
 TTTCGCTAA TTTCCAGCAA GCTTTGACT TTCTTTCTGA ACACCCCTCGA CGAAGTTTA  
 CTCTTCTGTT CCCTTCAAAA ACTACTTGGG TGCTTTTTT AAATTTAACT TTATTGAATT  
 TTGCTCCTT TTTCTTTTT ATGGTTTTAG ACTTGGGTA TTCAATGTT GACAAAATTC  
 CAGTTGGTTA TCGAATTATG AATGCTATAT TTCAAAACGC AGCTACACGT TCTGCTGGCT  
 TTACGGTGGT TGATTTAAGC CAAATGCTC CGGCAGTAAT GGTGACCTAC ATGTTTATGA  
 TGTATATCTC TGCCTATCCA ATCGCAATGA GTATTGACCA AACTAATGTT TACGAGGAAC  
 GTTCTCTGG AATATATGCA GCAGACACCG AAAATGATGA TGATAATAAT ATTAATAATA  
 ATAATAATGA TAATAATACG CCGAAAAGGA AAAATTTTTT GATGGACCAT ATACAAAGGC  
 AACTGAGTCA CGATTTGTGG TATTATTCC TAGGCTACTT CATAATTACT ATAGTCGAAG

Fig.3A

GTCGTCGATT AGAGTCGGAA GCGGAACCGC AATTTACGCT TTTTGTATT TTATTCGAGG  
TGATTCAGG CTATGGCACT GTGGGCCTAA GCTTAGGGTA CAAAAATGAT CCTTCGCTTA  
CGGCTCAGTT TCGGAAAATT AGCAAACCTG TTATGGTTGC ACTACAGATT CGTGGACGAC  
ATAGAGGACT TCCAAGTGCA TTAGATAGAG CAGTGCTAAT GCCTTCGGAT AAAAACTTG  
ACCGGGAAGA AGAGGATTAT ATGAGACGTC ACGGGAAAAAA AAATACTAAT AGAGCAGACC  
CGGTACCCAG TTCTTAATGA TTATAACCTC ACGGTTGATT AGACTTACTT TCTATGAAAA  
TGCAAGGCAA GGTCAAGGAGC TAATGAAACT TGTACTGTAT CTTCTGGTTC TGTGCCATT  
TAACTGATTG GGCCTTAAAA GAACCTTTG TTTTATTTA TTTTAC

Fig.3B

//

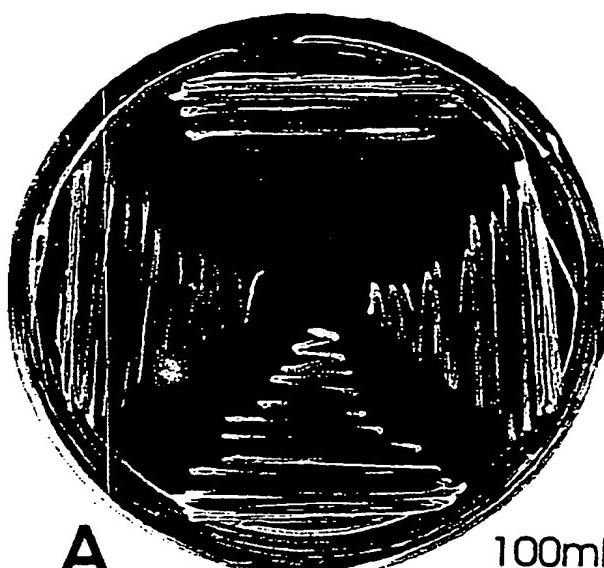
ID HERG PRELIMINARY; DNA; 4070 BP.  
 DE HUMAN PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT (HERG) mRNA, COMPLETE CDS.  
 AC U04270;  
 OS HOMO SAPIENS  
 OC EUCLAYOTAE; METAZOA; CHORDATA; VERTEBRATA; GNATHOSTOMATA; MAMMALIA;  
 OC EUTHERIA; PRIMATES; CATARRHINI; HOMINIDAE; HOMO.  
 RN [1] (BASES 184-3663)  
 RA WARMKE J.W., GANETZKY B.  
 RT "A NOVEL FAMILY OF POTASSIUM CHANNEL GENES RELATED TO EAG IN  
 RT "DROSOPHILA AND MAMMALS  
 RL PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. (1994) IN PRESS  
 RN [2] (BASES 1-4070)  
 RA WARMKE J.W.  
 RT "DIRECT SUBMISSION  
 RL SUBMITTED (09-DEC-1993) JEFFREY W. WARMKE, GENETICS AND MOLECULAR  
 RL BIOLOGY, MERCK RESEARCH LABORATORIES, 126 EAST LINCOLN AVENUE, P.O.  
 RL BOX 2000, RAHWAY, NJ 07065, USA  
 FH KEY LOCATION/QUALIFIERS  
 FH  
 FT SOURCE 1..4070  
 FT /CLONE="PBII+HH1, PBII+HH10, PBHH10-4.5"  
 FT /CLONE\_LIB="STRATAGENE NUMBER 936205 HUMAN HIPPOCAMPUS  
 FT CDNA LIBRARY"  
 FT /CHROMOSOME="7"  
 FT /ORGANISM="HOMO SAPIENS"  
 FT /TISSUE\_TYPE="HIPPOCAMPUS"  
 FT /DEV\_STAGE="2 YEAR OLD"  
 FT /SEX="FEMALE"  
 FT CDS 184..3663  
 FT /STANDARD\_NAME="HUMAN EAG RELATED GENE"  
 FT /GENE="HERG"  
 FT /NOTE="NCBI GI: 487738"  
 FT /PRODUCT="PUTATIVE POTASSIUM CHANNEL SUBUNIT"  
 FT /CODON\_START=1  
 FT /TRANSLATION="MPVRRGHVAPQNTFLDTIIRKFEQQSRKFIIANARVENCAVIYC  
 FT NDGFCELCGYSRAEVVMQRPTCDFLHGPRTRQRRAAQIAQALLGAEERKVEIAFYRKD  
 FT GSCFLCLVDVVPVKNEDGAVIMFILNEVVMKDMVGSPAHDTNHRGPPTSMLAPGRA  
 FT KTFRKLKPALLALTARESSVRSGGAGGAGAPGAVVVVDVLTPAAPSSESLALDEVTAM  
 FT DNHVAGLGPAAERRALVGPGSPPRSAPGQLPSRAHSLNPDASGSSCSLARTRSRESC  
 FT ASVRASSADDIEAMRAGVLPPPDRHASTGAMHPLRSGLLNSTSDSLVRYRTISKIP  
 FT QITLNFVDLKGDPLASPTSDREIIAPKIKERTHNVTEKVTVQVLSLGADVLPEYKQQA  
 FT PRIIRWTILHYSPFKAVWDWLILLLVITYAVFTPYSAAFLLKETEEGPPATECGYACQ  
 FT PLAVVDLIVDIMFIVDILINFRRTTYVNANEEVVSHPGRIAVHYFKGWFLIDMVAAPF  
 FT DLLIFGSGSEELIGLLKTARLLRLVRVARKLDRYSEYGAAVLFLLMCTFALIAHWLAC  
 FT IWYAIIGNMEQPHMDSRIGWLHNLDQIGKPYNSGGLGGPSIKDKYVTALYFTFSSLTS  
 FT VGFGNVPNTNSEKIFSICVMLIGSLMYASIIFGNVSAIIQRLYSGTARYHTQMLRVRE  
 FT FIRFHQIPNPLRQRLEEFQHAWSYTNGIDMNAVLKGFPECLQADICLHLNRSSLQHC  
 FT KPFRGATKGCLRALAMFKTTTHAPPGDTLVHAGDLTALYFISRGSIIEILRGDVVVAI  
 FT LGKNDIFGEPLNYARPGKNSGDVRALTYCDLHKIHRRDDLLEVLDMDYPEFSDHFWS  
 FT EITFNLRDTNMIPGSPGSTELEGGFSRQRKRKLSFRRRTDKDTEQPGEVSALGPGRA  
 FT AGPSSRRGGPGWGESPSSGPSSPESSEDEGPGRSSSPRLVPFSSPRPPGEPPGGE  
 FT LMEDCEKSSDTCPNPLSGAFGVSNIFSFWGDSRGRQYQELPRCPAPTPSLLNIPLSSP  
 FT GRRPRGDVESRLDALQRQLNRLETRLSADMATVLQLLQRQMTLVPPAYSAVTTPGPGP  
 FT TSTSPLLPSPLPTLTLDLSQSQVSMACEELPPGAPELPQEGPTRRLSLPGQLGALT  
 FT SOPLHRHGSDPGS"  
 CC ORIGIN  
 SQ SEQUENCE 4070 BP; 713 A; 1413 C; 1255 G; 689 T;  
 ACGCGGCCTG CTCAGGCCCTC CAGCGGCCGG TCGGAGGGGA GGCGGGAGGC GAGCGAGGAC  
 CGCGCCCGC AGTCCAGTCT GTGCCGCCGG GTGCTCGCTT GGCGCGGTGC GGGACCAAGCG  
 CGCGCCACCC GAAGCCTAGT GCGTCGCCGG GTGGGTGGGC CGGCCCGGC CGCATGGGCTC  
 AGGATGCCGG TCGGGAGGGGG CCACGTCGCCG CGCAGAAC A CCTTCCTGGA CACCATCATC  
 CGCAAGTTG AGGGCCAGAG CCGTAAGTTC ATCATCGCCA ACGCTGGGT GGAGAACTGC  
 CGCGTCATCT ACTGCAACGA CGGCTCTGC GAGCTGTGCG GCTACTCGCG GGCGAGGTG

ATGCAGCGAC CCTGCACCTG CGACTTCCTG CACGGGCCGC GCACGCAGCG CCGCGCTGCC  
 GCGCAGATCG CGCAGGCACT GCTGGCGCC GAGGAGCGA AAGTGGAAAT CGCCTTCTAC  
 CGGAAAGATG GGAGCTGCTT CCTATGTCTG GTGGATGTGG TGCCCGTGA GAACGAGGAT  
 GGGGCTGTCA TCATGTTCAT CCTCAATTTC GAGGTGGTGA TGGAGAAGGA CATGGTGGGG  
 TCCCCGGCTC ATGACACCAA CCACCGGGGC CCCCCCACCA GCTGGCTGCC CCCAGGCCGC  
 GCCAAGACCT TCCGCCTGAA GCTGCCCGCG CTGCTGGCGC TGACGGCCCG GGAGTCGTCG  
 GTGCGGTGCG CGGGCGGGG CGGGCGGGGC GCCCCGGGGG CGTGGTGGT GGACGTGGAC  
 CTGACGCCCG CGGCACCCAG CAGCGACTCG CTGGCCCTGG ACGAAGTGA AGCCATGGAC  
 AACACACGTGG CAGGGCTCGG GCCCAGGGAG GAGCGGCGTG CGCTGGTGGG TCCCAGCTCT  
 CGGCCCCCGA CGCGCCCGG CCAGCTCCA TCGCCCCGGG CGCACAGCCT CAACCCCGAC  
 GCCTCGGGCT CCAGCTGAG CCTGGCCCGG ACAGCTCCC GAGAAAGCTG CGCCAGCGTG  
 CGCCCGCCCT CGTCGGCCGA CGACATCGAG GCCATGCCG CGGGGGTGT GCCCCCGCCA  
 CCGCGCCACG CGAGCACCGG GGCCATGCAC CCACTGCAC GCGGCTTGCT CAACTCCACC  
 TCGGACTCCG ACCTCGTGCCTTACCGC ATTAGCAAGA TTCCCCAAAT CACCCCTCAAC  
 TTTGTGGACC TCAAGGGCGA CCCCTTCTTG GCTTCGCCA CCAGTGAACCG TGAGATCATA  
 GCACCTAAGA TAAAGGAGCG AACCCACAAT GTCACTGAGA AGGTCAACCA GGTCTGTCC  
 CTGGCGCCCG ACGTGCTGCC TGAGTACAAG CTGCAGGCAC CGGCATGCCA CGCTGGACC  
 ATCCCTGCATT ACAGCCCCCTT CAAGGGCGTG TGGGACTGGC TCATCTGT GCTGGTCATC  
 TACACGGCTG TCTTCACACC CTACTCGGCT GCCTTCCTGC TGAAGGAGAC GGAAGAAGGC  
 CGCCTGCTA CCGAGTGTGG CTAGCCCTGC CAGCGCTGG CTGTTGGT GACATCATGT  
 TCATTGTGGA CATCCTCATC AACCTCCGCA CCACCTACGT CAATGCCAAC  
 GAGGAGGTGG TCAGCCACCC CGGCCGCATC GCGTCCACT ACTTCAAGGG CTGGTTCTC  
 ATCGACATGG TGGCCGCCAT CCCCTTCGAC CTGCTCATCT TCGGCTCTGG CTCTGAGGAG  
 CTGATCGGGC TGCTGAAGAC TGCGCGGCTG CTGCGGCTGG GATCGCTACT CAGAGTACGG  
 CGCGGCCGTG CTGTTCTGC TCATGTGCAC TTTTGCCTC  
 ATCGCGCACT GGCTAGCTG CATCTGGTAC GCCATGCAC ACATGGAGCA GCCACACATG  
 GACTCACGCA TCGGCTGGT GCACAACTG GCGGACAGA TAGGCAAACC CTACAACAGC  
 AGCGGCCCTGG CGGGCCCCCTC CATCAAGGAC AAGTATGTGA CGCGCTCTA CTTCACCTTC  
 AGCAGCCTCA CCAGTGTGGG CTTCGGCAAC GTCTCTCCA ACACCAACTC AGAGAAGATC  
 TTCTCCATCT GCGTCATGCT CATTGGCTCC CTCATGTATG CTAGCATCTT CGGCAACGTG  
 TCGGCCATCA TCCAGCGGCT GTACTCGGGC ACAGCCCCCT ACCACACACA GATGCTGCGG  
 GTGCGGGAGT TCATCCGCTT CCACCAAGATC CCCAATCCCC TGCGCCAGCG CTCGAGGAG  
 TACTTCCAGC ACGCCTGGTC CTACACCAAC GGCATCGACA TGAACCGGGT GCTGAAGGGC  
 TTCCCTGAGT GCCTGCAGGC TGACATCTGC CTGACCTGA ACCGCTCACT GCTGCAGCAC  
 TGCAAACCCCT TCCGAGGGC CACCAAGGGC TGCTTCGGG CCCTGGCCAT GAAGTTCAAG  
 ACCACACATG CACCGCCAGG GGACACACTG GTGCATGCTG GGGACCTGCT CACCGCCCTG  
 TACTTCATCT CCCGGGGCTC CATCGAGATC CTGCGGGCG ACCTCGTCGT GGCCATCCTG  
 GGGAAAGATG ACATCTTGG GGAGCCTCTG AACCTGTATG CAAGGCTGG CAAGTCGAAC  
 GGGGATGTGC GGGCCCTCAC CTACTGTGAC CTACACAAGA TCCATGGGA CGACCTGCTG  
 GAGGTGCTGG ACATGTACCC TGAGTTCTCC GACCACTTCT GGTCCAGCCT GGAGATCACC  
 TTCAACCTGC GAGATACCAA CATGATCCCG GGCTCCCCCG GCAGTACGGA GTTAGAGGGT  
 GGCTTCAGTC GGCAACGCAA GCGCAAGTTG TCCCTCCGCA GGCGCACGGA CAAGGACACG  
 GAGCAGCCAG GGGAGGTGTC GGCTTGGG CGGGGGCGGG CGGGGGCAGG GCGGAGTAGC  
 CGGGGCCGGC CGGGGGGGGC GTGGGGGGAG AGCCCGTCCA GTGGCCCTC CAGCCCTGAG  
 AGCAGTGAGG ATGAGGGCCC AGGCCGCAGC TCCAGCCCC TCCGCCTGGT GCCCTTCTCC  
 AGCCCCAGGC CCCCCGGAGA GCGCCGGGT GGGGAGCCCC TGATGGAGGA CTGCGAGAAG  
 AGCAGCGACA TTGCAACACC CCGTCAGGC GCCTTCTCAG GAGTGTCCAA CATTTCAGC  
 TTCTGGGGGG ACAGTCGGGG CGGCCAGTAC CAGGAGCTCC CTCCATGCC CGCCCCCACC  
 CCCAGCCTCC TCAACATCCC CCTCTCCAGC CGGGGTCCGC GGCCCCGGGG CGACGTGGAG  
 AGCAGGCTGG ATGCCCTCCA GCGCAGCTC AACAGGCTGG AGACCCGGCT GAGTGCAGAC  
 ATGGCCACTG TCTGCACTG GCTACAGGG CAGATGACGC TGGTCCCCTGCC CGCCTACAGT  
 GCTGTGACCA CCCCCGGGGC TGCCCCACT TCCACATCCC CGCTGTTGCC CGTCAGCCCC  
 CTCCCCACCC TCACCTTGAA CTCCGTTTCT CAGGTTTCCC AGTTCATGCC GTGTGAGGAG  
 CTGCCCCGGG GGGCCCCAGA GCTTCCCCAA GAAGGCCCCA CACGACGCCT CTCCCTACCG  
 GGCCAGCTGG GGGCCCTCAC CTCCAGGCC CTGCACAGAC ACAGGCTCGGA CCCGGGCAGT  
 TAGTGGGGCT GCCCCAGTGTG GACACGTGCC TCACCCAGGG ATCAAGGCGC TGCTGGGGCG  
 CTCCCCCTGG AGGCCCTGCT CAGGAGGCC TGACCGTGA AGGGGAGAGG AACTCGAAAG  
 CACAGCTCCT CCCCCAGCCC TTGGGACCAT CTTCTCCTGC AGTCCCCCTGG GCCCCAGTGA  
 GAGGGCAGG GGCAGGGCCG GCAGTAGGTG GGGCCTGTGG TCCCCCCACT GCCCTGAGGG  
 CATTAGCTGG TCTAACTGCC CGGAGGCACC CGGCCCTGGG CCTTAGGCAC CTCAAGGACT  
 TTTCTGCTAT TTACTGCTCT TATTGTTAAG GATAATAATT AAGGATCATA TGAATAATT  
 ATGAAGATGC TGATGACTAT GAATAATAAA TAATTATCCT GAGGAGAAAA

Fig.4B

//

102 011/507



A

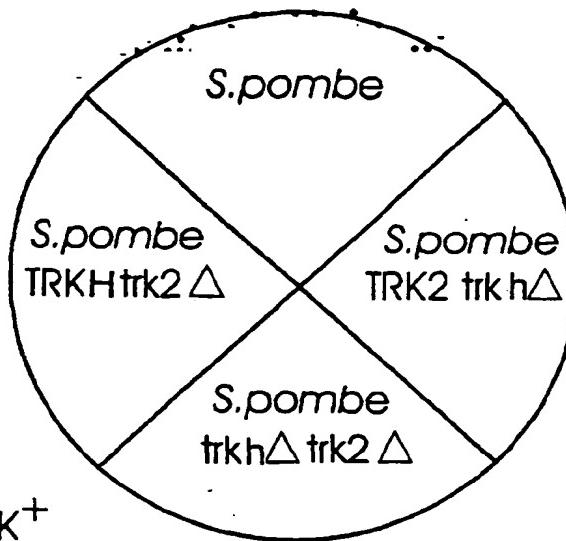
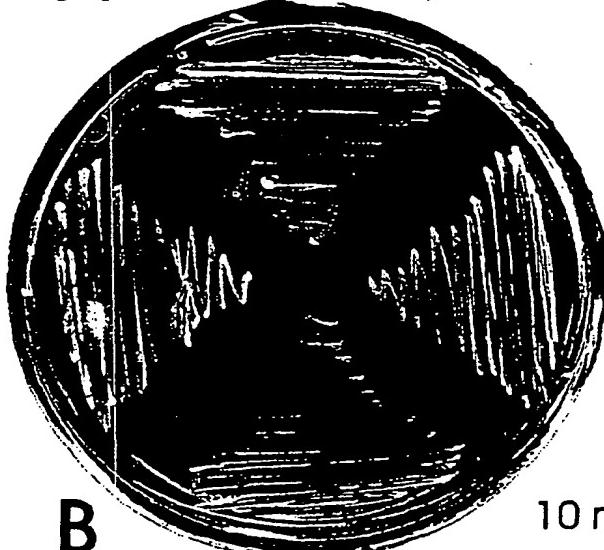
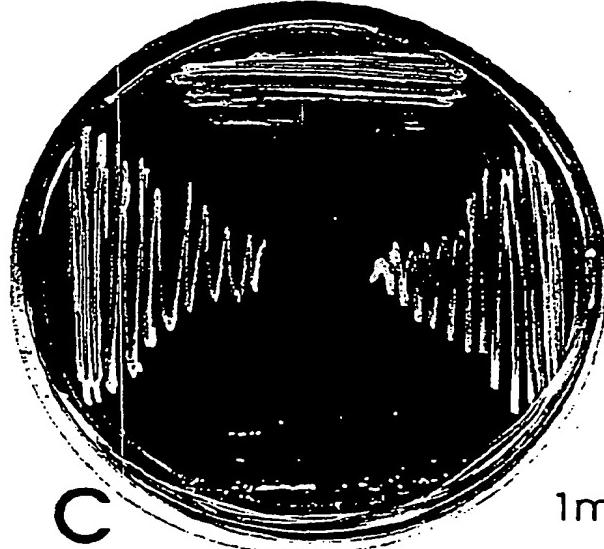
100mM K<sup>+</sup>

Fig.5



B

10 mM K<sup>+</sup>

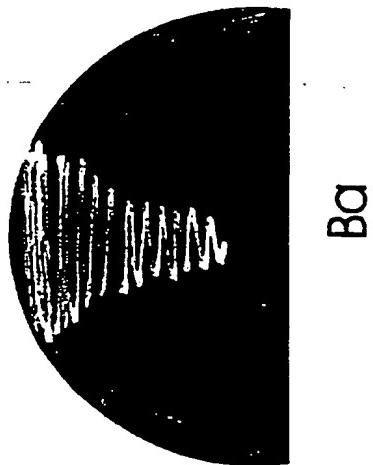
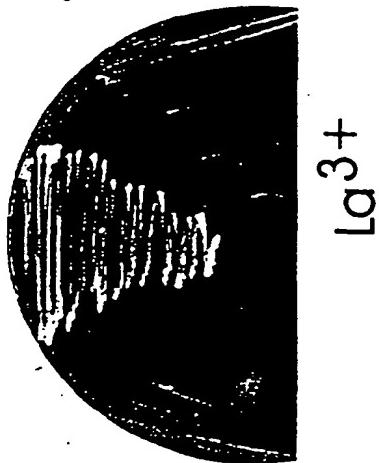
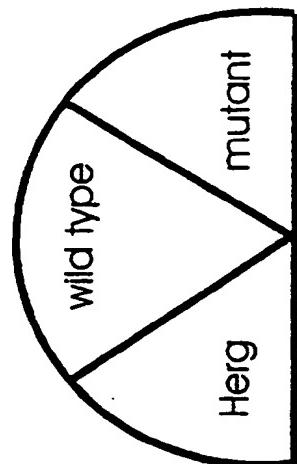
C

1mM K<sup>+</sup>

Fig.6

*S. pombe* Δtrkh,2*S. pombe**S. pombe* Δtrkh,2[HERG]*S. pombe* Δtrkh,2*S. pombe**S. pombe* Δtrkh,2[HERG]*S. pombe* Δtrkh,2*S. pombe**S. pombe* Δtrkh,2[HERG]100 mM K<sup>+</sup>10 mM K<sup>+</sup>1 mM K<sup>+</sup>

Fig.7



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**